

Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

Univerzitní studijní programy

Diplomová práce

Nanokompozitní materiály na bázi Zn-Cu-O a vermikulitu pro
medicínské aplikace

Nanocomposite materials based on Zn-Cu-O and vermiculite
for the medicine applications

Student: Bc. Marta Bukáčková

Vedoucí diplomové práce: Ing. Karla Čech Barabaszová, Ph.D.

Sídlo školy: Ostrava

2014

Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Marta Bukáčková**

Studijní program: N3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942T001 Nanotechnologie

Téma: Nanokompozitní materiály na bázi Zn-Cu-O a vermikulitu pro
medicínské aplikace
Nanocomposite materials based on Zn-Cu-O and vermiculite for the
medicine applications

Zásady pro vypracování:

Cílem diplomové práce bude sledování vlivu strukturních, morfologických a koncentračních změn na antibakteriální vlastnosti nanokompozitních materiálů na bázi směsných oxidů kovů a vermikulitu. Pozornost bude věnována materiálům, které naleznou uplatnění v traumatologické a stomatologické aplikaci. Diplomová práce bude plynule navazovat na realizovanou bakalářskou práci a z ní získané poznatky.

Diplomová práce bude tvořena třemi částmi, které budou dále členěny.

1. Teoretická část bude řešena formou literární rešerše na téma:

- nanomateriály využívané ve zdravotnictví s ohledem na traumatologii a stomatologii;
- antibakteriální kmeny v traumatologii a stomatologii;
- nanokompozitní materiály na bázi oxidů kovů využívané ve zdravotnictví.

2. Experimentální část bude zaměřena na:

- přípravu nanokompozitních materiálů na bázi směsných oxidů Zn-Cu-O/vermikulit s jasně definovaným koncentračním zastoupením;
- testování antibakteriálních vlastností na vybraných bakteriálních kmenech;
- fázovou analýzu, strukturní a morfologickou charakterizaci nanokompozitních materiálů pomocí rentgenové difrakční analýzy a skenovací elektronové mikroskopie.

3. V závěrečné části budou vyhodnoceny a diskutovány výsledky diplomové práce.

Seznam doporučené odborné literatury:

1. Li B., Yu S., Hwang J.Y. and Shi S. Antibacterial Vermiculite Nano - Material. Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering 1 (1), 2002, 61-68.
2. Zhang L., Ding Y., Povey M. and York D. ZnO nanofluids - A potential antibacterial agent. Progress in Natural Science 18, 2008, 939-944.
3. Yildirimer L., Thanh N.T.K., Loizidou M. and Seifalian A.M. Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles Nano Today 6, 2011, 585-607.
4. Guogang R. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. International Journal of Antimicrobial Agents 33, 2009, 587-590.

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Karla Čech Barabaszová, Ph.D.**

Datum zadání: 11.11.2013

Datum odevzdání: 15.05.2014



prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.
vedoucí katedry



prof. Ing. Petr Noskiewicz, CSc.
prorektor pro studium



Prohlašuji, že:

- Jsem byla seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména § 35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a § 60 – školní dílo.
- Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen „VŠB-TUO“) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě diplomovou práci užít (§ 35 ods. 3).
- Souhlasím s tím, že diplomová práce bude v elektronické podobě uložena v Ústřední knihovně VŠB-TUO k nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o kvalifikační práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB-TUO.
- Bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona
- Bylo sjednáno, že užít své dílo – diplomovou práci, nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněná v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB-TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).
- Beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1988 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě dne:

Podpis:

Jméno a příjmení autora práce:

Bc. Marta Bukáčková

Adresa trvalého pobytu autora práce:

Korunní 974/74 Ostrava - Mariánské Hory 709 00

Marta Bukáčková: Nanokompozitní materiály na bázi Zn-Cu-O a vermikulitu pro medicínské aplikace

Především chci poděkovat své vedoucí diplomové práce paní Ing. Karle Čech - Barabaszové, Ph.D. za odborný přístup, cenné rady a za pomoc při zpracování mé diplomové práce.

Prohlašuji, že jsem celou diplomovou práci vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu. Souhlasím s tím, že s výsledky mé diplomové práce může být naloženo dle uvážení vedoucího diplomové práce jako jejího spoluautora a doporučení vedoucího institutu.

V Ostravě dne.....

podpis

Abstrakt

Cílem diplomové práce je sledování vlivu strukturních, morfologických a koncentračních změn na antibakteriální vlastnosti nanokompozitních materiálů na bázi oxidů mědi, zinku a směsných oxidů kovů vypěstovaných na vermikulitové matrici. Pozornost je věnována materiálům, které najdou uplatnění v traumatologické a stomatologické aplikaci. Nanokompozitní materiály jsou připraveny mechanochemickou syntézou, strukturně a fázově charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie a rtg. difrakční analýzy. Antibakteriální účinek nanokompozitních materiálů je testován na vybraných bakteriálních kmenech.

Klíčová slova

Koncentračně definované nanokompozitní materiály, mechanochemická syntéza, antibakteriální účinek.

Abstract

The aim of this thesis is to observe the impact of structural, morphological and concentration changes on antibacterial properties of nanocomposite materials based on oxides of copper, zinc and mixed metal oxides grown on vermiculite matrix. Attention is paid on materials which can find applications in traumatology and stomatology. Nanocomposite materials are prepared by mechanochemical synthesis and structure and phase characterised by scanning electron microscopy and x-ray diffraction analysis. Antibacterial effect of nanocomposite materials is tested on selected bacterial strains.

Key words

Concentration defined nanocomposite materials, mechanochemical synthesis, antibacterial effect.

OBSAH

Úvod.....	10
1. TEORETICKÁ ČÁST DIPLOMOVÉ PRÁCE	11
1.1. Působení nanomateriálů na lidský organismus	11
1.1.1. Nanočástice zlata.....	13
1.1.2. Nanočástice stříbra	14
1.1.3. Nanočástice oxidu křemičitého	16
1.1.4. Nanočástice oxidu titaničitého	16
1.1.5. Uhlíkaté nanotrubičky	17
1.1.6. Kvantové tečky.....	17
1.1.7. Nanočástice superparamagnetického oxidu železa	18
1.2. Antibakteriální nanomateriály využívané ve zdravotnictví	19
1.2.1. Polymerní nanostrukturované materiály	20
1.2.2. Nanomateriály využívané ve stomatologii	21
1.2.2.1.Polymerní matrice ve stomatologii	22
1.2.2.2.Plníva ve stomatologii	24
1.2.2.3.Spojovací činidla ve stomatologii	25
1.2.2.4.Iniciátory a urychlovače	26
1.2.2.5.Pigmenty a další složky ve stomatologii	26
1.2.3. Nanomateriály využívané v traumatologii	27
1.2.3.1.Regenerace nervové tkáně.....	27
1.2.3.2.Regenerativní medicína.....	28
1.3. Bakteriální kmeny v traumatologii a stomatologii	29
1.3.1. <i>Actinomyces</i>	32

1.3.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	32
1.3.3. <i>Escherichia coli</i>	32
1.3.4. <i>Klebsiella</i>	33
1.3.5. <i>Proteus</i>	33
1.3.6. <i>Pseudomonas</i>	33
1.3.7. <i>Staphylococcus aureus</i>	34
1.3.8. <i>Streptococcus</i>	34
2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	36
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST DIPLOMOVÉ PRÁCE	37
3.1. Příprava nanokompozitních materiálů	37
3.2. Antibakteriální testy nanokompozitů	40
3.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	40
3.2.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	42
3.2.3. <i>Escherichia coli</i>	44
3.2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
3.3. Charakterizace nanokompozitů	48
3.3.1. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).....	48
3.3.2. Rentgenová difrakční analýza (RTG)	51
4. ZÁVĚR.....	54
Literatura.....	56

Úvod

Tato diplomová práce navazuje na poznatky z bakalářské práce na téma Nanokompozity na bázi oxidů kovů a jejich antibakteriální stabilita (Marta Bukáčková, Bakalářská práce, 2012, 38 s.), kde byly připraveny, charakterizovány a testovány základní vlastnosti nanokompozitů na bázi mědi a zinku. Bylo zjištěno, že tato oblast je široká a zahrnuje množství zajímavých oblastí aplikace. V této práci je pozornost zaměřena na nanokompozitní materiály na bázi oxidů kovů s ohledem na jejich využití v medicínské praxi.

Teoretická část diplomové práce se v hlavním měřítku zabývá popisem působení nanostrukturovaných materiálů a možností jejich aplikace do lidského těla. Cílem je prozkoumat dosavadní znalosti a najít nové nanostrukturované materiály příhodné pro lidské tělo a současně takové, aby eliminovaly riziko poškození a toxického působení na okolní orgány, popř. tkáně. K doposud nejsledovanějším nanostrukturovaným materiálům patří nanočástice stříbra, zlata, oxidu křemičitého a za specifických podmínek uhlíkaté nanotrubičky. Ty jsou často dopravovány do vnitřních orgánů.

Práce je zaměřena na nové nanokompozitní materiály na bázi oxidů kovů, zejména koncentračně definovaných oxidů mědi a zinku, s hlavním cílem využití pro nové nanokompozitní pryskyřice a plniva zubních kazů ve stomatologii a současně jako zpevňující plniva kostních štěpů pro traumatologii, s cílem jejich kompatibility s okolní tkání.

1. TEORETICKÁ ČÁST DIPLOMOVÉ PRÁCE

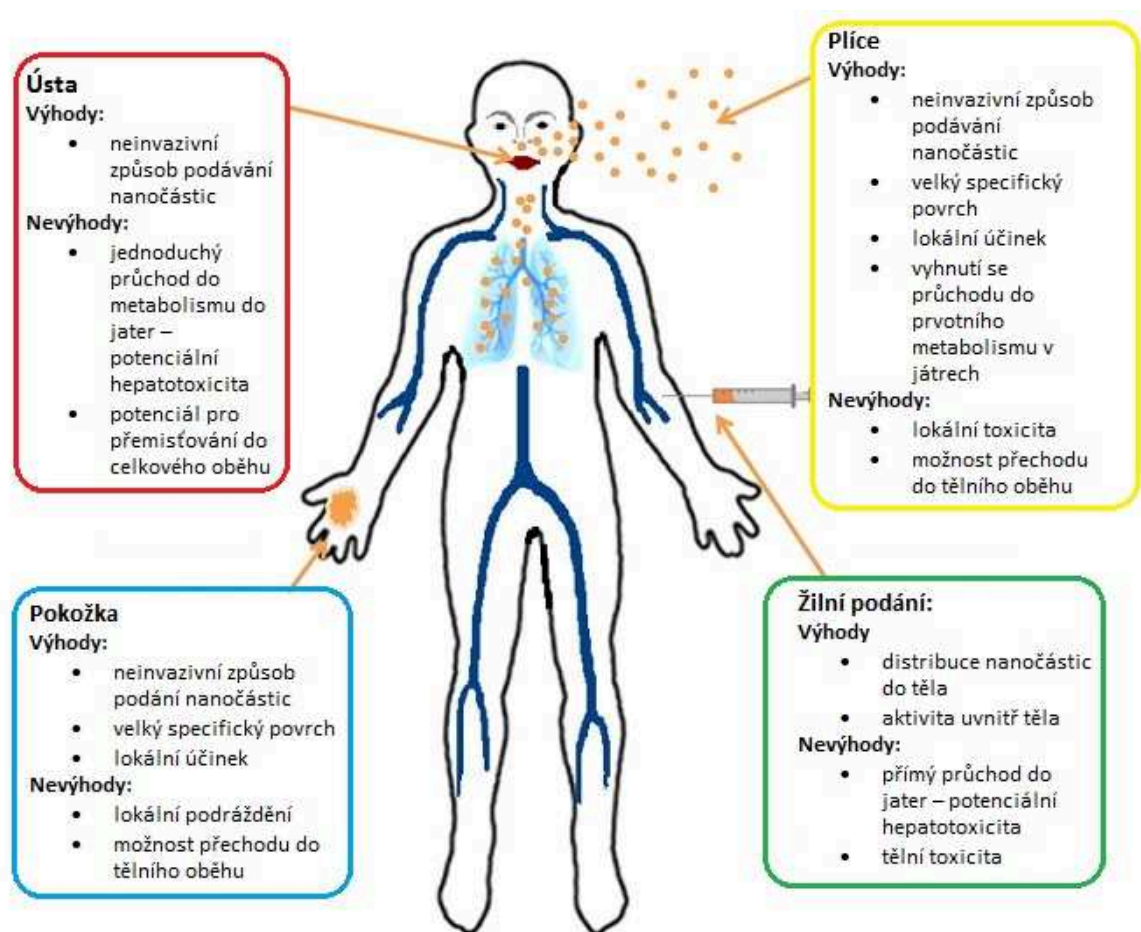
1.1. Působení nanomateriálů na lidský organismus

V současné době se v aplikacích zdravotních materiálů používají dva odlišné pojmy, rozlišují se medicínské a biomedicínské aplikace. Medicínskými aplikacemi se rozumí prostředky, přípravky nebo postupy, které jsou léčebné, slouží k vyléčení onemocnění nebo zranění, nebo potlačení symptomů. Biomedicína je obor lékařské vědy, která se zabývá schopností člověka snášet napětí a rozdíly v oblasti životního prostředí. Jedná se o aplikaci principů přírodních věd (biologie, fyziologie) a klinické medicíny a zabývá se vlivem prostředí na lidský organismus [1].

Nanomateriály, resp. nanostrukturované materiály, mají široký potenciál využití v medicínských a biomedicínských aplikacích. Mohou být použity jako nosiče léčiv a genů, fluorescenční a kontrastní látky, k zobrazení a sledování tkání a buněk apod. [2].

Nanočástice vykazují jedinečné vlastnosti, které mohou být a jsou využívány v mnoha biomedicínských aplikacích. Nicméně, tyto jedinečné vlastnosti jsou rovněž základem pro biotoxicitu nanočástic, která vyplývá ze vzájemného působení vlastností částic (např. velikost, tvar, povrchová chemie a náboj), podané dávky a imunologické integrity hosta. V poslední době je kladen větší důraz na zkoumání vlivu nanočástic na lidský organismus v závislosti na způsobu podání, což je jeden z faktorů, který může ovlivňovat potenciální toxicitu. Současný výzkum se zaměřuje na objasnění mechanismů základní toxicity nanočástic, o které se předpokládá, že se pohybuje od zánětlivých reakcí a buněčné nekrózy až po ROS - indukovanou apoptózu (tj. buněčnou smrt) [3] [4].

Existují a jsou zaznamenávány čtyři základní způsoby podání nanočástic do lidského organismu. Jsou to cesty skrz ústa, plíce, pokožku anebo žilní podání. Všechny tyto vstupy mají své výhody i nevýhody, které jsou popsány a vyobrazeny na Obr. 1. Mimo to jsou známy reakce působení nanočástic na lidský organismus v souvislosti s vnitřními orgány. Ty jsou popisovány na základě laboratorních experimentů a patologických změn a to v převážné míře realizovaných na zvířatech [5].



Obr. 1: Způsoby podání nanočástic a jejich nejdůležitější výhody a nevýhody [2].

Pokožka je největším orgánem těla a plní funkce první bariéry mezi externím prostředím a vnitřními orgány lidského těla. Následně je vystavena nadbytku nespecifikovaných útoků ze vzduchu, stejně jako různým potenciálně toxickým látkám z krémů, sprejů nebo oblečení. Místně aplikované nanočástice mohou potenciálně pronikat do pokožky a putovat do tělního oběhu a způsobovat nežádoucí účinky v celém těle [2].

Plíce jsou důležitým orgánem pro cílenou léčbu, z důvodu neinvazivních přírodních inhalačních léčeb, jejich velkého povrchu, lokalizaci/akumulaci léčiva v plicních tkáních a vyhnutí se jednostranného průchodu do metabolismu, čímž se redukuje celkové vedlejší nežádoucí účinky. Nosné nanomateriály v přenosu léčiv do plic mají několik výhod, které mohou být využívány pro léčebné procesy, a proto jsou intenzivně studovány [6] [7].

Játra jsou orgánem, který je snadno zranitelný toxicitou nanočástic, protože zde dochází k prvnímu průchodu nanočástic metabolismem. Také bylo dokázáno, že v játrech se nanočástice systematicky shromažďují i po skončení vystavení působení nanočástic [2].

Mozek má na rozdíl od jater velmi omezené regenerační schopnosti, a proto musí být obzvláště chráněn před vnějšími hrozbami. Toho je dosaženo ochrannou hematoencefalickou bariérou, která odděluje mozkomíšní mok obklopující mozek od krevního oběhu. Avšak, někdy může být vynechání bariéry výhodné a potenciálně může zachránit život, v případě akutních stavů jako jsou mozková meningitida a chronické onemocnění (demence, Parkinsonova choroba). Cílený transport léčiv umožňuje použití menších dávek a tak lze snižovat nežádoucí účinky na organismus. Avšak chování nanočástic po přemístění do centrálního nervového systému vyžaduje toxikologické analýzy [8].

V následujících podkapitolách jsou shrnuty poznatky a reakce působení anorganických nanostrukturovaných materiálů na lidský organismus, které jsou v současné době ve zdravotnictví používány a známy. Tyto nanostrukturované materiály jsou v převážné míře aplikovány do lidského těla ve formě aditiv anebo sloučenin již známých materiálů, ne však samostatně.

1.1.1. Nanočástice zlata

Nanočástice zlata vykazují celou řadu užitečných vlastností. Mohou tvořit netoxické a biokompatibilní kovové jádro, které je činí ideálním základním prvkem nanometrických nosičů, nosičů léčiv a cílových látek skládajících se ze dvou a více materiálů. Nanočástice zlata tak plní různé povrchové funkce, které jim poskytují vysoce všestranné nástroje pro zasáhnutí buňky [2].

Nanočástice zlata jsou zkoumány pro klinické aplikace včetně dermálních nosičů léčiv kvůli snadnému způsobu jejich syntézy a potenciálu pro bioaplikace. Byla ukázána závislost velikosti částic na průchodu nanočástic kůži po lokálním podání, menší nanočástice pronikají hlouběji do tkáně než větší, které se hlavně shromažďují v povrchové epidermis (nejsvrchnější vrstva kůže) a dermis (škára; pojivová tkáň, která je pevně spojena s epidermis). Tyto objevy mohou mít důležité důsledky vzhledem k účinným dermálním nosičům léčiv, které pronikají skrz pokožku. Sloučeniny zlata jsou obecně považovány za

bezpečné a byly v běžné klinické praxi používány po mnoho let (při léčbách, revmatických zánětech). Avšak při zmenšování velikosti do oblasti nanometrů, je známo, že dochází k vážným změnám z hlediska jejich biochemických vlastností, které si vyžadují nový výzkum cytotoxicity. Některé studie ukázaly, že buněčný prostup nanočástic zlata je funkcí času, velikosti částic a koncentrace [9] [10].

Nanočástice zlata hrají důležitou roli v biomedicíně a mají řadu možných aplikací v poli zobrazování, podávání léků a genů. Jsou to cenné částice v oblasti zobrazování *in vitro* i sledování buněk *in vivo*. V těchto odvětvích je však zapotřebí do detailu prozkoumat, co se s nanočásticemi dále po použití děje. Zda dojde k úplnému vyloučení z těla, nebo se nanočástice hromadí v některém z orgánů, kde se mohou i po delším čase začít toxicky projevovat [2] [11].

1.1.2. Nanočástice stříbra

Nanočástice stříbra se staly v posledních letech často využívané pro svůj značný antibakteriální účinek, který je využíván v medicínských aplikacích v prostředcích, jako jsou stříbrem impregnované obvazy, antikoncepční prostředky, chirurgické instrumenty a kostní protézy [2] [12].

Nanočástice stříbra jsou jedny z nejstudovanějších nanočástic z pohledu toxicity. Je to důsledkem právě toho, že nanočástice stříbra jsou hojně využívány v celé řadě produktů od obvazů až po oblečení. Avšak musí být specifikováno toxické působení nanočástic stříbra na mikroorganismy a objasněno zejména za účelem vyloučení případných nežádoucích účinků těchto částic i na další druhy buněk uvnitř lidského organismu. Přijímání stříbra a lokální aplikace může způsobovat benigní choroby známé jako argyrie, šedomodré zabarvení kůže a jater způsobené ukládáním částic stříbra v bazálních vrstvách nebo podobných tkání. Tato skutečnost vedla k okamžitému vydání limitních doporučených denních dávek stříbra [13].

Byly provedeny studie toxicity zaměřené na nanočástice stříbra v buněčných vláknech obsahujících myší fibroblasty, potkaní játra, lidské hepatocelulární karcinomy a lidské rakovinné buňky kůže. Všechny studie pozorovaly zvýšení produkce ROS (reaktivního kyslíku) a oxidativní stres způsobující buněčnou smrt a apoptózu (programovou buněčnou smrt), při koncentracích mezi 2,5 a 200 µg/l. Stupeň toxicity byl závislý na koncentraci a

měnil se s různými povrchovými povlaky. Skutečný mechanismus toxicity nanočástic stříbra je neznámý, ale existují dvě pravděpodobné cesty – tvorba ROS a oxidativní stres. Jednak nadměrná produkce ROS překračuje antioxidantní kapacitu buňky, oxidativní stres je způsoben následnou produkcí zánětlivých center, poškozením DNA a apoptózou. Studie dermálního průniku jsou ideálně uskutečňovány na prasečí kůži, vzhledem k její podobnosti s lidskou z hlediska tloušťky a stupně absorpce. Byla zkoumána biokompatibilita prasečí kůže po denní lokální aplikaci krémů s obsahem nanočástic stříbra během 14 za sebou jdoucích dní (0,34-34 $\mu\text{g/ml}$). Byla pozorována depozice nanočástic, v závislosti na dávce, v povrchových vrstvách *stratum corneum* (rohová vrstva; nejvrchnější vrstva epidermis. Tvoří ji mrtvé zrohovatělé buňky obsahující keratin. Nejvíce je vyvinuta v místech vystavených výraznějšímu tlaku). V jiné studii byla zase zkoumána reverzibilní toxicita stříbra na pacientech s popáleninami, které byly léčeny obvazy napuštěnými nanočásticemi stříbra. Tyto výsledky ukazovaly reverzibilní toxicitu nanočástic stříbra a přechodné zabarvení exponované kůže [9] [14] [15].

Nanočástice stříbra mohou proniknout do oběhu prostřednictvím několik různých cest. Mnohé studie dokázaly, že nanočástice stříbra mají sklon k hromadění se v játrech, kde způsobují toxicitu vyvolaným oxidačním stresem. Mezi parametry ovlivňující míru toxicity nanočástic stříbra patří koncentrace částic, velikost, tvar a schopnost poškození buněk antioxidantů [16] [17].

Opakované podávání nanočástic menších rozměrů (< 100 nm) vede k jejich hromadění v orgánech, převážně v játrech, zatímco větší částice (> 100 nm) se hromadí hlavně ve slezině. Tento způsob absorpce částic se řídí velikostí pórů kapilárních otvorů (~ 100 nm). Akumulace v závislosti na dávce byla již dříve pozorována u zkoumaných zvířat po požití opakovaných perorálních dávek nanočástic stříbra. Lidský organismus prokázal zžednutí kůže po orálním požití nanočástic stříbra. Tyto výsledky ukazují schopnost gastrointestinální absorpce nanočástic stříbra s následnou distribucí po organismu a akumulací v různých tkáních [2].

1.1.3. Nanočástice oxidu křemičitého

Nanočástice oxidu křemičitého (SiO_2) jsou již často využívané zejména v nemedicínských aplikacích jako aditiva do různých leštidel, kosmetiky, laků a potravinářských přísad. Relativně nedávno byly tyto látky představeny na biomedicínském poli jako bioznačkovače, léčebné prostředky při rakovině a nosiče léků. Nanočástice oxidu křemičitého jsou považovány za „bezpečné“ v mírných dávkách ($< 20 \mu\text{g/ml}$). Ale už při dávce $25 \mu\text{g/ml}$ nanočástice oxidu křemičitého vykazují sklon k tvoření shluků a při kritické koncentraci $50 \mu\text{g/ml}$ vykazují cytotoxicitu. Buněčná smrt je zprostředkována tvořením reaktivního kyslíku (ROS) a peroxidací lipidové membrány. Když pomineme koncentrační závislost, nanočástice oxidu křemičitého vykazují toxicitu v závislosti na velikosti částic [18] [19].

Biomedicínské aplikace pro nanočástice oxidu křemičitého jsou široké a zahrnují mimo jiné i stanovování diagnózy a podávání léků. I přes toto slibné využití v oblasti medicíny, stále chybí pro tyto částice důkladné hodnocení míry jejich cytotoxicity. Byly provedeny studie, které ovšem poskytly rozporuplné výsledky. Pro tuto oblast je potřeba další systematický výzkum. Jeden z výzkumů uvádí, že nanočástice oxidu křemičitého o velikostech menších než 25 nm jsou biokompatibilní a netoxické vůči myšímu jaternímu parenchymu. Další z výzkumů uvádí, že nanočástice větší než 100 nm způsobují zánět jaterních buněk (hepatocytů) a následnou smrt těchto buněk, což je způsobeno fagocytózou těchto větších částic. Na rozdíl od těchto závěrů, jiná studie popisuje akutní toxicitu nanočástic oxidu křemičitého o velikostech pod 100 nm . K těmto zdánlivě rozporuplným výsledkům může vést několik faktorů. Jedním z hlavních může být přítomnost nebo absence a typ povlaku nanočástic, stejně jako velikost nanočástic [20] [21] [22].

1.1.4. Nanočástice oxidu titaničitého

Nanočástice oxidu titaničitého (TiO_2) mají několik vlastností, které z nich dělají výhodnou přísadu do komerčních výrobků, opalovacích krémů a kosmetiky. Vykazují vlastnosti ovlivňující působení UV záření a poskytují lepší průhlednost a estetiku krémů. *In vitro* studie ukázaly buněčnou toxicitu TiO_2 závislou na typu ovlivňující buněčné funkce, jako je buněčné množení, distribuce částic, pohyblivost a apoptóza (programová buněčná smrt). Tyto nežádoucí účinky však nemohly být zopakovány *in vivo*. Vzhledem k posouzení kapacity průniku, studie dermálního pronikání byla zkoušena na lidských dobrovolnících s použitím

různých výzkumných technik. Při opakovaném podávání byl objeven průnik kůží nanočástic TiO_2 , které byly obsaženy v opalovacích krémech. Histologické hodnocení biopsie kůže odhalilo, že TiO_2 proniká do otevřených částí chlupových váčků jako protiklad živým vrstvám epidermis a dermis. Dále množství titanu v každém váčku bylo menší než 1% aplikovaného celkového množství opalovacího krému. Povrchová penetrace skrz váčky ochlupení nebo póry byla potvrzena i další studií, která zjistila, že prostup kůží byl větší, když se opalované krém aplikoval na místa s relativně větší hustotou ochlupení [2] [23].

1.1.5. Uhlíkaté nanotrubičky

Uhlíkaté nanotrubičky vzhledem k jejich specifické strukturní povaze rovněž vykazují unikátní využití v medicínské aplikaci. Lze je využít při dopravě léčiv, pro fotodynamickou léčbu anebo pro konstrukce využívané k „opravám“ poškozených tkání. Tak rozsáhlý potenciál však vyžaduje pečlivé vyhodnocení jejich toxicity [2].

Uhlíkaté nanotrubičky jsou často využívány pro *in vivo* inhalační modely. Vykazují biomedicínský potenciál v oblastech distribuce léčiv, fotodynamické léčby a skelety pro vytváření tkání. Předchozí studie vyzdvihly především možnou toxicitu jednostěnných (angl. single walled carbon nanotubes, SWCNT) a víceštěnných (angl.. multi walled carbon nanotubes, MWCNT) uhlíkatých nanotrubiček. Po intratracheálním vkapání uhlíkatých nanotrubiček myším byly pozorovány plicní epiteloidní granulomy a intersticiální zánět s následnými fibrotickými změnami. Výsledky z expozice zvířat MWCNTs jsou však protichůdné. Některé pokusy dokládají toxicitu srovnatelnou s toxicitou azbestu, zatímco jiné studie ukázaly, že MWCNT jsou biokompatibilní. Tyto rozdíly lze vysvětlit jemnými variacemi ve složení nanotrubiček a způsobu podání (intratracheální nebo prostupem) do celého těla a použití těchto nanomateriálů vyžaduje další studie [24] [25] [26].

1.1.6. Kvantové tečky

Kvantové tečky jako nanostrukturované materiály mohou rovněž sloužit pro diagnostické a terapeutické účely. V současné době nacházejí kvantové tečky neocenitelné použití v experimentální aplikaci, vizualizaci nervových kmenových a progenitorových buněk (kmenových buněk) v rozvinutých myších embryích *in vivo*, kde působí jako nanotransportní

látky, v cílené protidrogové léčbě mozku a vymezení mozkových maligních buněk pro přesné resekce tumoru. Dřívější studie poukázaly na skutečnost, že nanočástice dokážou obejít hematoencefalickou bariéru (BBB) a dostat se do mozku prostřednictvím čichového epitelu nebo trojklanného nervu a potenciálně tam způsobit újmu. Další výzkum na toto téma ukázal, že i přes zvýšené množství nanočástic v mozku myší, nedocházelo k žádným známkám zánětu, ztrátám nervových buněk (neuronů) nebo jiným funkčním poruchám. Tyto výsledky naznačují, že pro klinické nebo terapeutické účely se cesta přes hematoencefalickou bariéru ukazuje jako slibná v budoucím řízení patologií centrálního nervového systému. Avšak omezené klinické údaje o toxických účincích a nedostatek delších *in vivo* studiích toxicity vyzývá k potřebě značné pozornosti a systematickému hodnocení kvantových teček určených pro účely použití v mozku [27].

1.1.7. Nanočástice superparamagnetického oxidu železa

Nanočástice *superparamagnetického oxidu železa* (dále jen SPIONy) jsou jedněmi z mála klinicky schválených nanočástic oxidů kovů a nachází všestranné aplikace na poli biomedicíny, jako je např. magnetická rezonance (dále jen MRI), podávání léčiv a genů a hypertermické destrukce nádorových tkání. Jejich superparamagnetismus přináší několik výhod: [2].

- a) schopnost být řízeny externím magnetickým polem (může být zužitkováno v cíleném zobrazení nebo dodávce léčiv na určité místo),
- b) produkcí cytotoxického tepla, když jsou vystaveny alternativnímu magnetickému poli (lze použít v léčení rakoviny).

SPIONy a ultrajemné SPIO nanočástice (dále jen USPIONy) se skládají z jádra složeného z oxidu železitého a různých vrstev sacharidů, která určuje buněčnou absorpci a biologický poločas života. Unikátní fyzikálně - chemické vlastnosti, které jsou vlastní všem nanočásticím, jako je velikost v měřítku nanometrů a velký specifický povrch, činí SPIONy cennými zejména pro nové terapeutické a diagnostické aplikace [9] [28] [29] [30].

1.2. Antibakteriální nanomateriály využívané ve zdravotnictví

Antibakteriální aktivita souvisí s látkami, které lokálně zabíjí bakterie nebo zpomalují jejich růst bez toho, aby byly všeobecně toxické i pro okolní orgány. Obecně mohou být látky klasifikovány jako baktericidní, které zabíjí bakterie, nebo bakteriostatické, které zpomalují bakteriální růst [31].

Mezi materiály s antibakteriálním a antifungiálním (proti plísňovým) účinkem řadíme nanočástice stříbra, mědi a zinku a další. Částice stříbra i titanu lze aplikovat do dentálních kompozitů k zlepšení biokompatibility a k antibakteriálním účinkům kompozitních materiálů. Nanočástice stříbra vykazují široké antibakteriální a protizánětlivé účinky. Antibakteriální dentální materiály se používají k eliminaci zánětů, které mohou vzniknout v zubu, jehož kaz je ošetřen výplní [32].

Oxid zinečnatý (ZnO) lze použít jako antibakteriální materiál. Předchozí studie dokázaly antibakteriální aktivitu ZnO proti bakteriím *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a dalším. Částice ZnO efektivně inhibují gram-pozitivní i gram-negativní bakterie a to i jejich zárodky, které jsou odolné vůči vysokým teplotám a tlakům [33] [34].

U nanočástic ZnO platí, že čím menší částice jsou, tím vykazují lepší antibakteriální aktivitu, která je závislá především na specifickém povrchu a koncentraci částic a méně na jejich tvaru a krystalové struktuře. Antibakteriální aktivita nanočástic ZnO je také závislá na teplotě, čím větší je teplota, tím jsou méně aktivní [33].

Další kov, který lze použít jako antibakteriální materiál, je měď. **Oxid měďnatý** (CuO) je levnější v porovnání s nanočásticemi stříbra, snadno se dá smísit s polymery a je fyzikálně i chemicky stabilní. Nanočástice CuO mají extrémně veliký specifický povrch, mimořádné krystalové morfologie a jsou efektivní v inhibici celé řady patogenních bakterií včetně nozokomiálních kmenů vyskytujících se v nemocnicích [35].

Jako nanokompozitní materiál s baktericidními vlastnostmi lze použít nanočástice CuO v mezivrstvě jílového minerálu montmorilonitu, které byly zkoumány na bakteriích *E. coli*. Tento nanokompozit lze připravit tepelnou dekompozicí. Experimentem bylo zjištěno, že nanokompozit CuO/montmorilonit vykazuje větší antibakteriální aktivitu než samotný CuO [36].

Nanočástice oxidu titaničitého (TiO_2) jsou široce využívány, protože vykazují fotokatalytické vlastnosti, a to zejména při ultrafialovém záření, kdy vytvářejí reaktivní formy kyslíku (ROS). Bývají používány jako samočisticí nátěry, ke sterilizaci povrchů, přidávají se do cementů a asfaltů pro stavební a silniční účely i do tunelových staveb z důvodu čištění vzduchu a redukci přítomného NO_x . TiO_2 v kosmetice způsobuje ochranu před slunečním zářením, stabilizuje složky krémů, zvyšuje průnik vitamínů a antioxidantů do pokožky, zlepšuje účinnost UV filtrů a dělá produkty estetičtější (transparentnost). [37] [38].

V poslední době se hojně využívá nanokompozit hydroxyapatit/ TiO_2 . Tyto kompozity se využívají zejména k tvorbě zubních implantátů. TiO_2 přidaný do hydroxyapatitu slouží jako zpevňující činidlo [39].

Nanočástice stříbra jsou významné díky svým antibakteriálním účinkům, bylo dokázáno, že působí antibakteriálně proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím. Antibakteriální účinek nanočástic stříbra je do značné míry ovlivněn typem a velikostí nanočástic a nekontrolovatelným uvolňováním nanočástic stříbra nebo iontů stříbra z nosné matice [40] [41].

Antibakteriální bionanokompozity lze připravit začleněním stříbra do polymerní matrice, jako je agar, chitosan a celulóza. V nanokompozitu stříbro/polymer mohou polymerní matrice pomáhat ke kontrole uvolňování iontů stříbra změnou interakce mezi nanočásticemi stříbra a polymerním materiálem [40].

1.2.1. Polymerní nanostrukturované materiály

Bionanokompozitní materiály jsou slibnou třídou hybridních materiálů získaných z přírodních a syntetických biologicky rozložitelných polymerů a organických nebo anorganických plniv. Polymerní nanokompozity jsou obecně výsledkem kombinace polymerů a anorganických a organických výplní v měřítku nanometrů. Mimořádná všestrannost těchto materiálů vychází z toho, že je k dispozici velké množství různých biopolymerů i výplní. Mezi biopolymery lze zařadit polysacharidy, alifatické polyestery, polypeptidy, proteiny, polynukleové kyseliny a další, plniva zahrnují mimo jiné jíly, hydroxyapatit a kovové částice. Interakce mezi složkami plniva nanokompozitů jim umožňují, díky nanometrické velikosti,

působit jako molekulární mosty v polymerní matici. To je základem pro lepší mechanické vlastnosti nanokompozitů ve srovnání s běžnými mikrokompozity [42].

Biokompozitní materiály rovněž splňují biokompatibilitu a (nebo) biologickou odbouratelnost (materiály mohou být degradovány a postupně vstřebávány a odstraněny z těla). Proto lze tyto nanokompozity použít v medicínských aplikacích, např. v tkáňovém inženýrství, výměně (opravě) kostí, stomatologických aplikacích a řízeném uvolňování léčiv [42].

Polymerní nanočástice jsou biokompatibilní, lze modifikovat jejich povrch a jsou schopny regulovaného uvolňování aktivního léčiva. Vykazují možnosti aplikace v léčbě různých plicních chorob, jako je např. astma, chronické obstrukční plicní nemoci (COPD), tuberkulózu (TB) a rakovinu plic, stejně jako extrapulmonární stavy jako diabetes [2].

V dnešní době existuje velké množství organických nanopolymerů (mimo jiné např. kolagen, želatina, chitosan, alginát a hovězí sérový albumin). Kromě těchto dochází v poslední době k pokrokům ve vývoji syntetických polymerů, jako jsou biologicky kompatibilní a biologicky odbouratelné polymery kyseliny mléčné (PLGA) pro použití nosičů léčiv. I přesto, že tyto nanonosiče představují perspektivní alternativy léčby rakoviny, je potřeba vyhodnotit jejich cytotoxicitu (schopnost zabíjet buňky). Nanočástice PLGA úspěšně zlepšují terapeutické výsledky a snižují nepříznivé účinky prostřednictvím trvalého a cíleného transportu léčiv. Kromě toho využívání biologických materiálů, jako je chitosan nebo hovězí sérový albumin dále snižuje toxicitu, zatímco jejich biologická kompatibilita a biodegradovatelnost umožňuje snadné nanočásticové povrchové úpravy. U albuminu, nejpoužívanějšího sérového proteinu, byla dokázána biokompatibilita, což je užitečné např. v použití jako stabilizátoru pro dodávku léků. [2] [9].

1.2.2. Nanomateriály využívané ve stomatologii

V dnešní době se ve stomatologii využívají v hojné míře nanomateriály na bázi nanokompozitů. Nanokompozitní materiály umožňují zlepšovat kontinuitu mezi strukturou zubu a částicemi, které se používají k výplním poškozených zubů. Poskytují více stabilní a přirozené rozhraní mezi mineralizovanou tvrdou tkání zubu a pokročilými regeneračními biomateriály [43] [44].

Ve stomatologii jsou problémy způsobující potíže se zubními náhradami dvojího typu. Jednak jsou to samotné materiály, které jsou použity k nahrazení zubní struktury, pak jsou to také bakterie žijící v ústní dutině. Jako hlavní důvod nefunkčnosti a odpadnutí hmot dotvářejících zubní struktury se ukazují druhotné zubní kazy. Druhotné zubní kazy jsou převážně způsobeny rozšířením bakterií, které způsobují plak (bakterie produkující kyseliny), jako jsou např. *Streptococcus mutans* a *Streptococcus lactobacillus* v přítomnosti fermentovatelných sacharidů. K vytvoření dlouhodobých náhrad je zapotřebí využít potenciálu antibakteriálních materiálů. V současné době je stále více zkoumána možnost využití nanočástic, které by složily k regulaci tvorby biofilmů a zabránění vytváření zubních kazů [45].

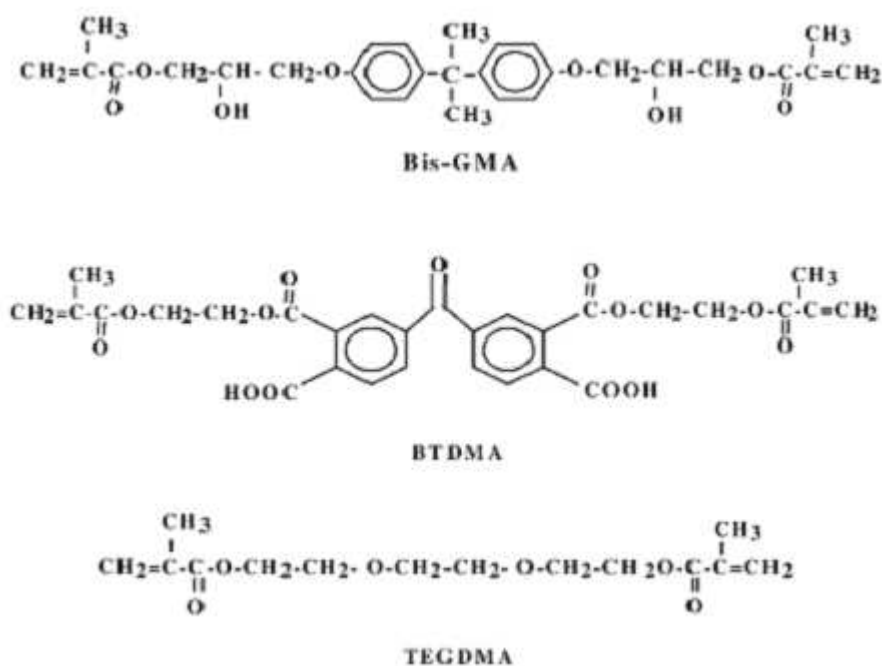
Nanotechnologie poskytují kompozitní pryskyřice, jejichž částice jsou výrazně menší než u dříve používaných materiálů, mohou být rozpuštěny ve vyšších koncentracích, a polymerací poskytují jedinečné fyzikální a mechanické vlastnosti a lepší estetickým dojmem. Materiály na bázi nanokompozitních materiálů se využívají k nahrazení chybějících zubů nebo jejich částí, ke změně barvy a tvaru zubů, ke všem účelům, které zlepšují zubní estetiku [43] [44].

Od roku 1960 přinesl rozvoj kompozitních materiálů lepší mechanické vlastnosti, nižší součinitel tepelné roztažnosti, menší dimenzionální změny, vyšší odolnost proti opotřebení. Kvalitu výplní tvořených kompozitními materiály také zlepšil pozdější vývoj kompozitních materiálů, které se používají pro lepení na strukturu zubu. Laboratorně zpracovávané kompozitní materiály se používají pro výrobu korunek a můstků, bývají vyztuženy vlákny a můžou být vázány na slitinové konstrukce. Kompozitní pryskyřice se skládají ze čtyř hlavních částí: organické polymerní matrice, částic anorganického plniva, spojovacího činidla a iniciátoru - urychlovače celého systému [43] [44].

1.2.2.1. Polymerní matrice ve stomatologii

Organická polymerní matrice je ve většině běžně používaných kompozitních materiálů složena buď z aromatického nebo uretanového diakrilátového oligomeru. Oligomery jsou viskózní kapaliny, jejichž viskozita bývá snížena na užitečnou klinickou úroveň přidáním monomerního ředidla [43].

Dva nejpoužívanější oligomery, které jsou používány v zubních kompozitních materiálech, jsou dimetakryláty 2,2 – bis [4(2-hydroxy-3 methakryloyloxy propyloxy)-fenylpropan a uretan dimethakrylát (dále jen UDMA). Tyto sloučeniny obsahují na obou koncích reaktivní dvojné vazby uhlíku, které se mohou účastnit adiční polymerace. Viskozita těchto polymerů po smíchání s plnivem je taková, že je potřeba použít ředidla, aby bylo dosaženo klinicky použitelné konzistence. Nejpoužívanější pryskyřicový kompozitní materiál je založen na kopolymeru připraveném z kombinace bis-GMA a triethylenglykoldimetakrylátu (dále jen TEGDMA) (Obr. 2) [43].



Obr. 2: Chemická struktura Bis-MGA, BTDMA a TEGDMA pryskyřicových kompozitních materiálů [43].

Do Bis-GMA se obvykle přidává TEGDMA, aby bylo dosaženo funkčních viskozit, protože tento kompozitní materiál má velkou viskozitu, která je způsobená intermolekulárními vodíkovými vazbami [43].

Bis-GMA se využívá jako hlavního monomeru ve většině kompozitních pryskyřic, díky jeho vynikající estetické kvalitě, jednoduchým pracovním technikám, zvýšené mechanické pevnosti, menšího smršťování, vyššího modulu pružnosti a snížené toxicitě (nízká těkavost a vodivost do tkání) oproti dříve používaným materiálům. Nejdůležitější problémy u těchto

pryskyřic jsou nedokonalá přilnavost na strukturu zubu a polymerační smršťování. Bylo věnováno úsilí k syntéze nových monomerů, které by mohly překonat tyto problémy [43].

Další používaný pryskyřicový kompozitní materiál obsahuje BTDMA, což je dimetakrylátový monomer, který obsahuje ve své struktuře karboxylové skupiny, které jak bylo dokázáno, mohou interagovat s ionty Ca^{2+} struktury zubu tak, že vykazují v dentálních kompozitních materiálech lepší přilnavost [43].

1.2.2.2. Plniva ve stomagologii

Vzhledem k tomu, že dentální kompozitní materiály nemůžou vydržet velké okluzní síly (síly působící na protilehlé zuby při skusu čelistí), které na ně působí, tak byly zkoumány mnohé způsoby, jak tyto kompozitní materiály posílit. Například zavedením vláken a whiskerů jako zpevňujících látek, některé anorganické pryskyřice jsou vyztuženy anorganickými plnivy [43].

V kompozitních materiálech bývá použita řada plniv, které přispívají ke zlepšení vlastností a vývoji technologií pro vylepšení kompozitních materiálů, které se využívají dnes. I přes mnohý vývoj nejsou dentální kompozitní materiály stále dostatečně houževnaté, pevné a trvanlivé, aby je bylo možno použít v namáhaných oblastech. Existuje řada využívaných plniv, které se používají obvykle v řádech mikro a nanometrů. Mezi používaná plniva patří SiO_2 , ZrO_2 a Al_2O_3 . Většina z plniv používaných k posílení zubních kompozitních materiálů jsou silikátová skla. Průměrná délka životnosti těchto kompozitních materiálů je 5 let. Pro srovnání, zubní amalgámy mají životnost více než 15 let [43].

Sklokeramika je polykrystalický materiál, který se skládá ze skleněné matrice a jedné nebo více krystalických fází. Skleněné výplně nejsou silné a vykazují trhliny, které se šíří buď přes skelné výplně, nebo se šíří kolem plniva. K překonání tohoto problému bývá využito skelných vláken, nanoporézních plniv, rozvětvených vláken, nebo keramických whiskerů [43].

Vzhledem k tomu, že anorganická plniva jsou podstatně tvrdší než zubní pryskyřice, tak se napětí přenáší přes výplň na pryskyřici. Tam, kde jsou ponořeny částice plniva, která mají zalomený nebo nepravidelný tvar, může být koncentrace napětí příliš vysoká. Takový stav má tendenci vytvářet malé praskliny kolem částic plniva, čímž se místně oslabuje matrice. Při

použití výztuže z nanovláken bylo prokázáno významné zlepšení mechanických vlastností dentálního kompozitního materiálu, jako jsou např. pevnost v ohybu a modul pružnosti. Malý průměr také dává velký poměr jejich povrchu k objemu, což může zpevňovat intermolekulární vodíkové vazby mezi plnivem a pryskyřicovou maticí [43].

Užitečné je klasifikovat dentální kompozitní materiály podle velikosti částic, tvaru a rozložení výplně. První kompozitní materiály obsahovaly kulovité částice o rozměrech 20 až 30 μm , následně produkty nepravidelných mikroskopických částic (0,04 až 0,2 μm), jemných částic (0,4 až 3 μm) a nakonec směsi, které obsahují převážně jemné částice s podílem ultrajemných částic. V závislosti na typu částic plniva jsou v současné době kompozitní materiály klasifikovány jako mikrohybridní výrobky a výrobky s mikrometrickou výplní. Mikrohybridní kompozitní materiály obsahují skla nepravidelného tvaru (borosilikátové sklo, hlinitokřemičitany bárnaté nebo strontnaté, stroncium nebo zinkové sklo) nebo křemičité částice s poměrně jednotným průměrem. Tyto kompozitní materiály mají typicky distribuci velikostí jemných částic plus mikrojemného plniva (5 – 15%). Toto rozdělení umožňuje efektivnější vyplnění, protože menší částice snadněji zaplní mezery mezi většími částicemi. Mikrohybridní kompozitní materiály obsahují 60 až 70 objemových % plniva, které v závislosti na hustotě plniva znamená 77 až 84 hm. % v kompozitu. Většina výrobců udává koncentraci plniva v hmotnostních procentech (hm. %). Kompozitní materiály s mikrometrickou výplní obsahují oxid křemičitý s velkou povrchovou plochou (100 až 300 m^2/g) s průměrem částic mezi 0,04 – 0,2 μm . Vzhledem k vysoké ploše povrchu může být do oligomeru přidáno jen 25 objemových % nebo 38 hmotnostních % proto, aby byla uchována konzistence směsi určená pro klinické aplikace [43].

1.2.2.3. Spojovací činidla ve stomatologii

Spojovací činidla, organosilany (silany) se aplikují na anorganické částice výrobce před tím, než se smísí s nezreagovaným oligomerem. Silany jsou spojovacími činidly, protože vytvářejí vazbu mezi anorganickými a organickými fázemi v kompozitním materiálu. Silan obsahuje funkční skupiny (methoxy-), které hydrolyzují a reagují s anorganickým plnivem, stejně jako nenasycené organické skupiny, které reagují s oligomery v průběhu polymerace. Během deposice silanu v plnivu se methoxylové skupiny hydrolyzují na hydroxylové skupiny, které reagují s adsorbovanou vlhkostí, nebo –OH skupinami plniv. Mohou také

kondenzovat s –OH skupinami na přilehlých hydrolyzovaných silanech a tvořit tak homopolymerní film na povrchu plniva. Během tuhnutí oligomeru reagují uhlíkové dvojné vazby silanu s oligomerem a tak se vytváří vazby z plniva prostřednictvím spojovacího činidla do polymerní matrice [43].

1.2.2.4. Iniciátory a urychlovače

Existují dva způsoby tuhnutí používaných kompozitních materiálů:

1. tuhnoucí při osvětlení světlem a
2. samo tuhnoucí, které byly v minulosti více používány.

Aktivace světlem se provádí modrým světlem o maximální vlnové délce cca 470 nm, která je obvykle absorbována fotoaktivátorem, který je v kompozitním materiálu v množstvích od 0,2% do 1%. Reakce je urychlována přítomností organického aminu, který obsahuje dvojnou vazbu uhlíku. Amin a (1R)-1,7,7-trimethylbicykloheptan-2,3-dion (kafrochinon) jsou stabilní v přítomnosti oligomeru při pokojové teplotě tak dlouho, dokud není kompozitní materiál vystaven světlu. Tato sloučenina je nejčastěji používaným fotoaktivátorem, někdy se také používá k rychlému tuhnutí kompozitních materiálů speciálních obloukových lamp. Chemická aktivace se provádí při pokojové teplotě organickým aminem (katalyzátor ve formě pasty), který reaguje s organickým peroxidem za vzniku volných radikálů, které následně napadají dvojné vazby uhlíku a dochází tak k polymeraci. Poté, co se obě pasty smísí, probíhá polymerační reakce rychle [43].

1.2.2.5. Pigmenty a další složky ve stomatologii

Obvykle se do kompozitních materiálů přidávají také anorganické oxidy, k dosažení odstínů, které odpovídají barvě většiny zubů. Četné odstíny jsou vyráběny ze světlých odstínů žluté až po odstíny šedé. Může být přidáván rovněž ultrafialový absorbent, aby se minimalizovaly barevné změny způsobené oxidací [43].

Kompozitní materiály jsou vytvářeny tak, aby obsahovaly urychlovače a iniciátory, které umožňují samopolymeraci, tuhnutí světlem a duální vytvrzování. Existují dva typy a tři třídy polymerních kompozitních materiálů sloužících k výplním, doplňování a utěšňování [43]:

Typ 1: materiály na bázi polymerů vhodné pro náhrady, zahrnující okluzní povrchy.

Typ 2: další materiály na polymerní bázi.

Třída 1: vlastní tuhnoucí materiály.

Třída 2: světlem tuhnoucí materiály.

Skupina 1: s energií použitou v ústní dutině.

Skupina 2: s energií použitou mimo ústní dutinu.

Třída 3: duálně tvrdnoucí materiály.

1.2.3. Nanomateriály využívané v traumatologii

Traumatologie je chirurgický obor zabývající se komplexní léčbou poranění, která jsou způsobena nehodami nebo násilným porušením kůže či tkání. Tento obor v sobě zahrnuje chirurgické zákroky a nápravu vzniklých poškození. S rozvojem nanotechnologií a nanomateriálů dochází i v tomto medicínském oboru k zlepšování možností léčby poranění [9].

1.2.3.1. Regenerace nervové tkáně

V posledních desetiletích došlo k rostoucímu zájmu o porozumění a možnosti aplikace nanotechnologií do nervového systému. Cílem těchto studií je vývoj možností pro regeneraci tkání, poškození mozku a opravy nervových tkání. V tomto odvětví se ukazují jako nejvhodnější k použití uhlíkaté nanotrubičky a nanočástice na bázi oxidů kovů, z důvodu jejich fyzikálních vlastností a jejich nedávno zdokumentované schopnosti propojování neuronových okruhů, synapsí a membrán [46].

Ideální materiál pro tyto aplikace musí splňovat několik požadavků. *Musí být biokompatibilní, neimunogenní a měl by zabránit vzniku zánětu a tvorbě jizev.* V tomto ohledu se jeví nanokompozitní materiály jako slibné materiály, které mohou být kontrolovatelně a opakovatelně připravovány. Jsou navrhovány tak, aby splňovaly

biokompatibilitu, podporovaly regeneraci neuronů v oblasti zranění a přispívali k řízené a lokalizované dopravě léků podporujících regeneraci [46].

1.2.3.2. Regenerativní medicína

Regenerativní medicína je jeden z nově vznikajících multidisciplinárních oborů, jehož cílem je obnovovat, zachovávat nebo spravovat tkáně a tím i funkce orgánů. Regenerace tkání může být dosaženo kombinací přítomnosti živých buněk, které poskytují biologickou funkcionalitu, a materiálů, které působí jako kostra pro podporu buněčného množení. Buňky savců jsou schopné reagovat na biologické signály, které dostávají z okolního prostředí, které je složeno ze složek o velikostech v řádu nanometrů. Proto je zapotřebí, aby materiály, které slouží k regeneraci částí lidského těla, vysílaly správné signály, které vedou k žádoucímu chování. Nanotechnologie jsou nejen dobrým nástrojem pro výrobu materiálů těchto struktur, ale také poskytuje možnosti, jak tyto struktury do lidského těla dopravit [47].

Vyhlídka na nahrazení poškozené tkáně, nebo na její regeneraci by měla radikální dopad na lékařskou vědu. Zájem o aplikaci nanotechnologií v regenerativní medicíně roste vzhledem k schopnostem vytvářet nanostruktury, které jsou schopny napodobit přirozené tkáně, stejně jako nanočástic, které lze použít při dopravě léčiv [47].

1.3. Bakteriální kmeny v traumatologii a stomatologii

Bakterie jsou jednobuněčné organismy o velikosti v řádu nanometrů. Jsou různých tvarů a velikostí. Povrch bakterií tvoří buněčná stěna, která je konstruována tak, aby poskytovala buňce pevnost, tuhost, tvar a chránila buňku od osmotického protržení a mechanických poškození. Vzhledem k její struktuře, součástech a funkcích může být buněčná stěna rozdělena do dvou hlavních kategorií gram-pozitivní a gram-negativní. Stěna gram-pozitivních buněk obsahuje tlustou vrstvu (20 – 50 nm) peptidoglykanu, který je spojen s kyselinou teichoovou, které jsou jedinečné gram-pozitivní buněčné stěně. Gram-negativní buněčná stěna je více složitá, jak strukturně, tak i chemicky. U gram-negativních bakterií buněčná stěna obsahuje tenkou vrstvu peptidoglykanu a vnější membrány, které pokrývají povrch. Vnější membrána gram-negativních bakterií často poskytuje rezistenci na hydrofobní sloučeniny včetně detergentů a obsahuje jedinečné součásti, lipopolysacharidy, které zvyšují negativní náboj buněčné membrány a jsou nezbytné pro strukturní integritu a životaschopnost bakterie [31] [9].

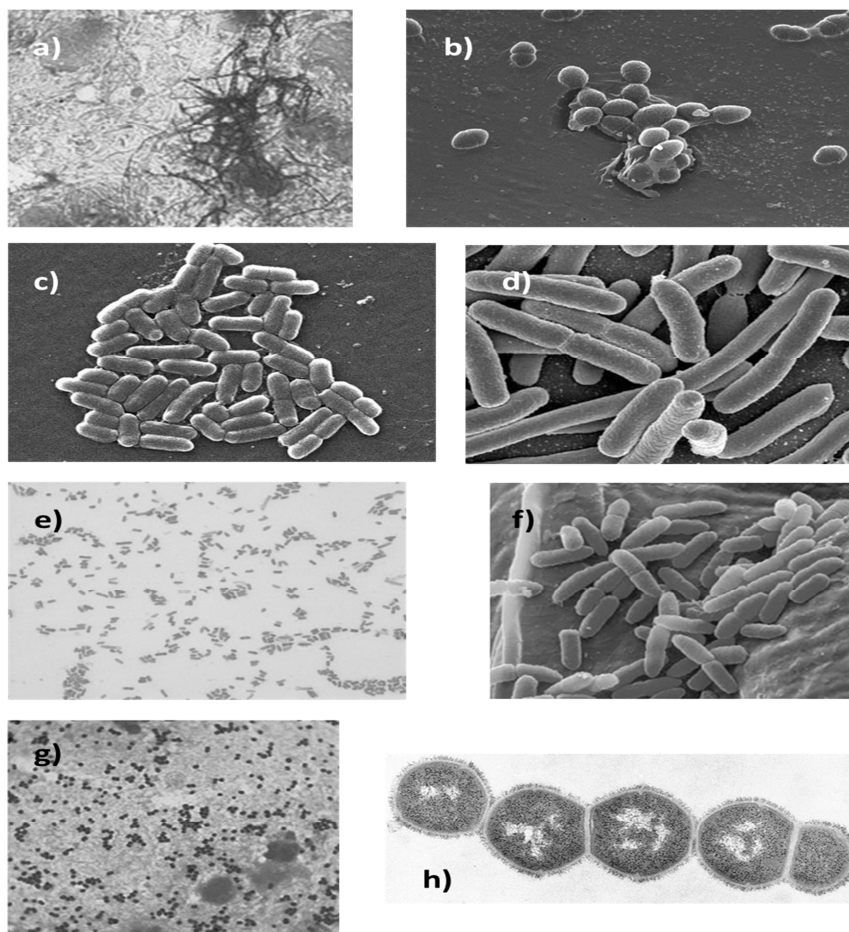
Jedním ze „snadných cílů“ bakterií jsou hospitalizovaní pacienti. Tito pacienti jsou náchylnější k infekcím, protože jejich organismus je často oslaben úrazem, chirurgickým zákrokem, nebo prodělánou nemocí. V prostředí nemocnic se navíc vyskytují bakteriální kmeny, které si vypěstovaly rezistivitu proti používaným desinfekčním přípravkům a antibiotikům. Jedním z vyskytujících se problémů v oblasti traumatologie je vznik pooperačních infekcí, kterým dávají vzniknout nozokomiální nákazy. Jsou to nákazy, které vznikají v souvislosti s pobytem v nemocnici. Nejčastějšími bakteriemi nozokomiálních nákaz jsou *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* a jiné. Mnohé z nozokomiálních nákaz jsou obtížně léčitelné kvůli značné rezistivitě těchto bakterií. Proto je důležité mít kontrolu nad bakteriálními kmeny, které tyto nemoci způsobují a hledat vhodná řešení léčby těchto chorob. Nozokomiálním nákazám lze předcházet pozorováním pooperačních infekcí a včasným řešením vznikajících infekcí. Tyto nákazy mají po světě za následky značné procento chorob i úmrtí a léčba těchto onemocnění silně zvyšuje náklady ve zdravotnictví. Přičemž v traumatologii hrají nejvýznamnější roli kmeny rezistentních bakterií *Escherichia coli*, *Enterococcus* a *Staphylococcus aureus* [48] [60].

Většinu z těchto infekčních onemocnění lze přiřadit do jedné z pěti kategorií: [48]

1. infekce a bakterie v moči způsobené dlouhodobým pobytem v hospitalizačním zařízení,

2. infekce operovaných ran,
3. nozokomiální zápal plic,
4. infekce močových cest způsobená katétrem,
5. gastrointestinální infekce.

Závažné bakteriální kmeny se vyskytují ve stomatologii, kde způsobují zubní kazy a další komplikace. Zubní kaz je běžné orální bakteriální infekční onemocnění. Je způsoben shlukem bakterií, které se podílí na progresi tvorby biofilmu zubního plaku a následné karyogeneze (dělení jádra, množení bakterií). Jeho prevence a léčba vyžaduje kontrolu přítomnosti bakteriálních původců chorob uvnitř zubního plaku. Existuje asi 700 druhů bakterií, které se můžou vyskytovat v ústní dutině. Některé z těchto druhů jsou považovány za symbiotické a předpokládá se, že mají pozitivní vliv na zdraví ústní dutiny, zatímco jiné jsou považovány za patogenní. Mezi tyto patogenní bakteriální kmeny patří především *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces*, *Streptococcus sobrinus* a *Lactobacillus*, které obvykle tvoří plak biofilmu na povrchu zubů. Bakteriální druhy *Streptococcus* a *Lactobacillus* způsobují demineralizaci skloviny svou acidogenitou a aciditou svých výměšků. Kromě toho se druhy *Actinomyces* podílí na časném vývoji plaku na povrchu zubů a přispívají ke kořenovým kazům a periodontálním infekcím (infekcím ozubice – tkáň obklopující kořen zubu tvořená vazy a sloužící jako jeho závěsný aparát). Bakterie *Streptococcus mutans*, která je primárním původcem zubního kazu, má schopnost tvořit biofilm [9] [49] [50].



Obr. 3: Snímky bakterií: a) *Actinomyces* [51], b) *Enterococcus faecalis* [52], c) *Escherichia coli* [53], d) *Klebsiella* [54], e) *Proteus* [55], f) *Pseudomonas aeruginosa* [56], g) *Staphylococcus aureus* [51], h) *Staphylococcus pyogenes* [56].

Dalšími běžnými onemocněními ústní dutiny jsou pulpální nemoci, při kterých hrají klíčovou roli mikrobi v kořenovém kanálku. Zde hraje klíčovou roli *Enterococcus faecalis*. Tento kmen je schopen přežít a odolávat v různých náročných podmínkách, je schopen odolat žlučovým solím, nedostatku potravy a mnoha antibakteriálních látek, takže je obtížné ho odstranit z kořenového kanálku dentálních stěn. [9], [49], [50].

V následujících podkapitolách je shrnuto několik informací o bakteriálních kmenech, které v oblasti traumatologie a stomatologie způsobují závažné komplikace a onemocnění.

1.3.1. *Actinomyces*

Actinomyces jsou gram-pozitivní bakterie, které mají tendenci růst v rozvětvených řetězcích (Obr. 3a). Patří mezi patogeny, které způsobují porušení sliznice (a pravděpodobně i normální dermis) a jsou schopni se usadit v tkáních, kde je přítomen velký redoxní potenciál. Jsou součástí normální flóry sliznice u lidí a zvířat. Usazují se především v ústní dutině [51].

1.3.2. *Enterococcus faecalis*

Bakterie *Enterococcus* (Obr. 3b) jsou jednou z příčin nozokomiálních nákaz a jsou známy především jako příčina infekční endokarditidy. Jsou odolné vůči řadě antimikrobiálních látek. Mezi přidružené nozokomiální infekce způsobované těmito bakteriemi patří infekce močových cest, infekce po chirurgických zásazích a přítomnost bakterií v moči. *Enterokoky* jsou často přítomné v nitrobrišní a pánevní infekci. Mezi další infekce patří také závažné infekce u novorozenců (včetně meningitidy), infekce centrálního nervového systému u dospělých, záněty kostí a kostní dřeně a plicní infekce [57].

1.3.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*, Obr. 3c) je částí mikroflóry trávicího ústrojí savců a ptáků, ale některé kmeny této bakterie jsou rovněž spojeny s průjmovými onemocněními u lidí i u zvířat. Patogenní *E. coli* si vyvinuly schopnost kolonizovat téměř každou část lidského organismu a způsobovat celou řadu onemocnění a symptomů. Extraintestinální (mimostřevní) patogenní *E. coli* infikují části sliznice mimo gastrointestinální trakt a jsou hlavní příčinou infekcí močových cest [56].

Mezi jeden z nejnebezpečnějších alimentárních patogenů patří jeden druh *Escherichia coli*, který produkuje tzv. shiga toxin. Tento kmen je nebezpečný zejména z důvodu závažných klinických projevů této infekce a schopnosti způsobovat velká ohniska výskytu. Mezi nevýznamnější způsob přenosu patří spotřeba kontaminovaných potravin [56].

1.3.4. *Klebsiella*

Klebsiella jsou nepohyblivé, gram-pozitivní tyčinkovité bakterie (Obr. 3d). Jsou nakažlivé pro velkou řadu zvířecích druhů i člověka, snadno přenositelné a to i ze zvířat na člověka. Tyto bakterie lze také najít jako volně žijící v ovzduší a jsou součástí mikroflóry ve střevech. *Klebsiella* jsou nozokomiální patogen, který způsobuje infekce močových cest, zápal plic, nitrobršní infekce, otravu krve, infekce horních cest dýchacích a další [58] [54].

1.3.5. *Proteus*

Bakterie *Proteus* (Obr. 3e) jsou gram-negativní aerobní bakterie. Jejich velikost je od 0,4 do 0,8 μm v průměru a 1 až 3 μm na délku. Jsou pojmenovány na základě jejich schopnosti podstupovat morfologické změny kolonií. Jsou pohyblivé pomocí bičíku. Mezi charakteristiky kultur *Proteus* patří jejich hemžení a amoniaková vůně. Bakterie *Proteus* lze najít v lidském a zvířecím gastrointestinálním traktu, kůži, sliznici ústní dutiny, rovněž i ve výkalech, půdě, vodě a rostlinách. Způsobují kažení potravin, syrového masa, mořských plodů, zeleniny a konzerv. Nález těchto bakterií v potravinách znamená, že infikovaná potravina nebyla připravena v hygienickém prostředí. Kmeny *Proteus* jsou schopny růst při teplotách v rozmezí od 10 do 43 °C. Optimální teplota je 25 °C [56].

1.3.6. *Pseudomonas*

Pseudomonas (Obr. 3f) jsou volně žijící bakterie, které se běžně vyskytují v půdě, podzemních vodách, rostlinách a živočiších, včetně člověka. I přes skutečnost, že bakterie rodu *Pseudomonas* jsou skutečné patogeny rostlin, *Pseudomonas aeruginosa* je rozvíjející se patogen celosvětového klinického významu. Je nejčastější příčinou střevní infekce, které obvykle pokračuje nekrotizujícím zánětem [56].

Obecně bakterie rodu *Pseudomonas* nejsou považovány za alimentární patogeny zodpovědné za typické gastrointestinální onemocnění, ale jsou spojeny především se znehodnocením nejrůznějších potravin, včetně ovoce a zeleniny. Mohou se šířit přímým kontaktem s infikovanými jedinci nebo požitím kontaminovaných potravin a vody. Způsobují perirektální infekce, dětské průjmy a další choroby [56].

Tyto bakterie hrají důležitou roli při hodnocení bezpečnosti potravin. Jsou-li přítomné v potravinách, upozorňuje to na to, že jsou v matici potraviny vhodné podmínky také pro růst dalších bakterií, které mohou způsobovat otravu jídlem [56].

1.3.7. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (Obr. 3g) jsou gram-pozitivní bakterie, které rostou v potravinách, stejně jako jsou přítomny u zvířat v rozsahu od 7 °C do přibližně 48 °C, s optimem při 35 °C, při výhodném pH rozmezí mezi 7,0 a 7,5, ale mohou také růst v nízkém pH 4,5. Buněčná stěna se skládá z tlusté vrstvy mukopeptidu. Na buněčné stěně jsou také přidruženy proteiny, které jsou vázány k peptidickým součástem mukopeptidu [56] [51].

Bakterie *Staphylococcus* byly poprvé identifikovány v roce 1880 z hnisu v abscesu kolenního kloubu. Od té doby víme, že jsou tyto mikroorganismy velmi časté přibližně u 20 až 50% lidí a zvířat, kteří jsou dlouhodobými nosiči (včetně pracovníků v potravinářství a nemocnicích). Převážně se vyskytují jako součást normální kožní flóry a předních nosních dírkách nosohltanu, ale i na krku a vlasech. Tyto rezistentní bakterie však nezpůsobují onemocnění. Nicméně poškození kůže, nebo jiné zranění, mohou dovolit bakteriím překonat přirozené ochranné mechanismy v těle, což může vést k infekci. Patří zde kožní infekce, jako jsou pupínky, plísňe, vředy, celulitida a abscesy. Tyto infekce mohou být, pokud se neléčí, dlouhodobé, ale nejsou tak závažné, jako když patogen napadá tělo, bakterie se vyskytují v krvi a mohou způsobit otravu krve. *Staphylococcus aureus* může také způsobovat zápal plic a meningitidu, které jsou častými příčinami pooperačních infekcí ran. Mnohé kmeny bakterií *Staphylococcus* jsou rezistentní vůči antibiotikům [56].

1.3.8. *Streptococcus*

Bakterie rodu *Streptococcus* (Obr. 3h) jsou kulovité, gram-pozitivní, nepohyblivé a bezsemenné bakterie. Mají v průměru 0,5 až 2μm. Tyto bakterie rostou v párech, nebo řetězech. Po 18 až 24 hodinách inkubace při 35 až 37 °C na krevním agaru se objevují typicky šedavě bílé, hladké, lesklé a průsvitné kolonie [56].

Onemocnění způsobované těmito bakteriemi zahrnují zápal plic, spálu, revmatickou horečku, celulitidu, meningitidu a další. *Streptococcus* byl spojen s jedním z prvních objevených onemocnění léčitelných antibiotiky. Tento rod bakterií hrál nevyhnutelnou roli v historii mikrobiologie a molekulární biologie. V průběhu let si však tento kmen vůči antibiotikům vypěstoval rezistenci [56].

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce je sledování vlivu strukturních, morfologických a koncentračních změn na antibakteriální vlastnosti nanokompozitních materiálů na bázi směsných oxidů kovů a vermikulitu. Pozornost je věnována materiálům, které najdou uplatnění v traumatologické a stomatologické aplikaci. Diplomová práce plynule navazuje na realizovanou bakalářskou práci [59] a z ní získané poznatky.

Diplomová práce je členěna do tří částí:

1. *Teoretická část* je formou literární rešerše zaměřena na oblast:

- působení nanomateriálů na lidský organismus;
- nanokompozitních materiálů a nanočástic využívaných ve zdravotnictví;
- základních poznatků ve zdravotnické praxi využívaných nanomateriálů s ohledem na oblast stomatologie a traumatologie;
- antibakteriálních kmenů nejčastěji se vyskytujících v traumatologii a stomatologii.

2. *Experimentální část* je věnována:

- přípravě nanokompozitních materiálů na bázi směsných oxidů Zn-Cu-O a Zn-Cu-O/vermikulit s definovaným koncentračním zastoupením;
- fázovou analýzu, strukturní a morfologickou charakterizaci nanokompozitních materiálů pomocí rentgenové difrakční analýzy a skenovací elektronové mikroskopie;
- testování antibakteriálních vlastností na vybraných bakteriálních kmelech vyskytujících v traumatologii a stomatologii.

3. *Závěr* vyhodnocuje a shrnuje výsledky teoretické a experimentální části diplomové práce.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST DIPLOMOVÉ PRÁCE

Experimentální část diplomové práce byla vypracována v laboratořích Centra nanotechnologií (VŠB-TU Ostrava). Antibakteriální testy byly realizované ve Zdravotním ústavu Ostrava.

Na základě literární rešerše (viz. teoretická část diplomové práce) bylo zjištěno, že významnými materiály, jejichž využití je soustředěno do medicínské a biomedicínské aplikace, jsou materiály na bázi oxidů kovů a na bázi křemičitých struktur. Z tohoto důvodu byly připraveny vzorky oxidu měďnatého, oxidu zinečnatého a jejich kompozitních materiálů na jílovém minerálu vermikulitu. Tyto experimentální vzorky byly charakterizovány a byly zkoumány jejich antibakteriálních vlastností.

3.1. Příprava nanokompozitních materiálů

Vzorky byly připraveny mechanochemickou syntézou. Pro tuto přípravu byly použity chemikálie: Na_2CO_3 , NaCl , CuCl_2 , ZnCl a vermikulit 407/08 Brazílie s frakcí pod $40\mu\text{m}$. Potřebná množství chemikálií pro jednotlivé vzorky, byla navážena na analytických vahách. Nejprve byly připraveny vzorky v poměru 1:1 použitých chemikálií. Prekursorů použitých chemikálií pro přípravu těchto experimentálních vzorků jsou uvedeny v Tab. 1.

Tabulka 1: Prekursorů základních experimentálních vzorků.

Vzorky	Na_2CO_3	NaCl	ZnCl	CuCl_2	vermikulit
ZnO	x	x	x		
CuO	x	x		x	
ZnO/vermikulit	x	x	x		x
CuO/vermikulit	x	x		x	x
Zn-Cu-O	x	x	x	x	
Zn-Cu-O/vermikulit	x	x	x	x	x

Připravené vzorky byly pomlety a homogenizovány v planetovém mlýnu FRITSCH pulverisette 7 v achátových mlecích nádobách s použitím 7 achátových kuliček a rychlostního stupně číslo 7 po dobu pěti minut.

Vzorky byly sušeny při teplotě 75 °C, několikrát promyty v destilované vodě, až nebyla v použité destilované vodě detekována přítomnost chloridů pomocí měřicích papírků, a následně byly vzorky přefiltrovány přes fritu a opět sušeny při teplotě 75 °C. Vysušené vzorky byly rozetřeny v achátové třecí misce a kalcinovány na teplotu 350 anebo 650°C po dobu 1,5 hodiny, a chlazeny v peci. Po kalcinaci byly vzorky opět rozetřeny v třecí misce.

U experimentálních vzorků obsahujících vermikulit byla analyzována koncentrace oxidů zinečnatého a měďnatého pomocí *rentgenové fluorescenční spektroskopie* (XRFS). Analýzy byly prováděny na komerčním přístroji energiově disperzním rentgenovém fluorescenčním spektrometru SPECTRO XEPOS. Vzorky s obsahem ZnO byly měřeny v tavenině, vzorky s CuO v peletách. V Tab. 2 jsou uvedeny stanovené koncentrace příslušných oxidů. Ztráty žíhání se pohybovaly přibližně kolem 2,1%. Z výsledků analýz je patrné, že teplota nemá výrazný vliv na změny koncentrací jednotlivých oxidů, popř. změny jsou minimální a nepřesahují rozdíl 5%. Z tohoto důvodu byly pro další experimentální práce všechny vzorky kalcinovány při teplotě 350°C po dobu 1,5 hodiny.

Tabulka 2.: Nanokompozitní materiály a koncentrace primárního CuO a ZnO na vermikulitové matrici v experimentálních vzorcích měřená pomocí XRFS.

Vzorky	CuO	ZnO
	[hm. %]	
ZnO/V 150	0,006	33,91
ZnO/V 350	<0,00051	37,55
ZnO/V 650	0,102	38,75
CuO/V 150	32,12	0,097
CuO/V 350	34,09	0,104
CuO/V 650	34,09	0,105
Zn-Cu-O/V 350	28,35	14,63
Zn-Cu-O/V 650	28,72	13,23

Na základě výsledků v Tab. 2 byly přepočteny navážky chemikálií tak, aby byly připraveny experimentální vzorky o koncentracích 15, 45 a 60 hm.% příslušných oxidů na vermikulitové matrici a jejich kompozitních materiálů (28 hm% CuO a 14 hm% ZnO , 28 hm% CuO a 45 hm% ZnO, 28 hm.% CuO a 60 hm. % ZnO) na vermikulitové matrici (viz

Tab 3). Koncentrace jednotlivých oxidů byla opět ověřena pomocí rentgenové fluorescenční spektroskopie (XRFS). Jejich reálné hodnoty jsou uvedeny v Tab. 3.

V Tab. 3 jsou uvedeny připravené experimentální vzorky, včetně koncentrační přítomnosti jednotlivých oxidů kovů a koncentrací směsných oxidů vypěstovaných na vermikulitové matrici. Všechny nanokompozitní vzorky byly kalcinovány při teplotě 350°C po dobu 1,5 hodiny. Celkově bylo pro experimentální práci zpracovááno 17 vzorků (viz. Tab. 2 a 3).

Tabulka 3: Značení a přehled připravených experimentálních vzorků nanokompozitních materiálů, jejich teoretické a reálné koncentrace.

Značení vzorku	Teoretické koncentrace oxidů kovů			Reálné koncentrace oxidů kovů	
	ZnO [hm. %]	CuO [hm. %]	vermikulit	ZnO [hm. %]	CuO [hm. %]
15Zn/V/350	15			16,56	0,002
34Zn/V/350	34			37,55	<0,00051
45Zn/V/350	45			42,49	<0,00006
60Zn/V/350	60			56,15	<0,00006
15Cu/V/350		15		0,088	18,32
33Cu/V/350		33		0,104	34,09
45Cu/V/350		45		0,107	43,13
60Cu/V/350		60		0,136	58,81
Cu14Zn/V/350	14	28		14,63	28,35
Cu28Zn/V/350	28	28		22,14	27,37
Cu45Zn/V/350	45	28		45,42	26,53
Cu60Zn/V/350	60	28		62,32	29,70

3.2. Antibakteriální testy nanokompozitů

Antibakteriální testy připravených vzorků byly provedeny ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě. Z hlediska antibakteriální aktivity byly testovány vzorky 15Cu/V/350, 33Cu/V/350, 45Cu/V/350, 60Cu/V/350, Cu₁₄Zn/V/350, Cu₂₈Zn/V/350, Cu₄₅Zn/V/350, Cu₆₀Zn/V/350, 15Zn/V/350, 34Zn/V/350, 45Zn/V/350 a 60Zn/V/350. Tyto vzorky byly testovány na bakteriálních kmenech *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960. Tyto bakteriální kmeny byly vybrány z důvodu jejich častého výskytu v oblastech traumatologie a stomatologie.

Antibakteriální testy byly na těchto bakteriích realizovány při různých koncentracích připravených vzorků: 10, 3,33, 1,11, 0,37, 0,12, 0,041 a 0,014 µg/ml. Vzorky byly testovány po dobu 30, 60, 90, 120, 180, 240 a 300 min, 1, 2, 3, 4 a 5 - ti dní.

3.2.1. *Staphylococcus aureus*

Bakterie *Staphylococcus aureus* se běžně vyskytují u některých lidí i zvířat bez toho, aby způsobovaly onemocnění. Ovšem i malé zranění, nebo poškození kůže může způsobit infekci. Tyto bakterie způsobují povrchová zranění kůže, lokalizované abscesy, infekce centrálního nervového systému, zápal plic, infekce močových cest a další. *Staphylococcus aureus* je rezistentní na léčbu antibiotiky a způsobuje problémy zejména v nemocničním prostředí.

V Tabulce 4 jsou uvedeny výsledky působení vzorku na bakterie 1 až 5 dní. V průběhu prvního dne došlo postupně k žádoucímu opožděnému nástupu účinnosti antibakteriálních vlastností zkoumaných vzorků.

Z výsledků je patrné, že nejúčinnější jsou vzorky Cu₄₅Zn/V/350 a 45Zn/V/350, které jsou účinné po dvou dnech v celé škále použitého zředění. Z výsledků po 5. dni měření lze konstatovat, že všechny zkoumané vzorky byly aktivní při zředěních 10 a 3,33 µg/ml.

U tohoto kmene bakterií byla prokázána antibakteriální aktivita všech zkoumaných vzorků a tyto vzorky lze dále použít k aplikačnímu využití v léčbě onemocnění způsobených bakteriemi *Staphylococcus aureus*.

Tabulka 4: Antibakteriální aktivita testovaných vzorků na bakteriálním kmeni *Staphylococcus aureus* CCM 3953.

Staphylococcus aureus CCM 3953																												
ředění	15Cu/V/350	33Cu/V/350	45Cu/V/350	60Cu/V/350	Cu14Zn/V/350	Cu28Zn/V/350	Cu45Zn/V/350	Cu60Zn/V/350	15Zn/V/350	34Zn/V/350	45Zn/V/350	60Zn/V/350																
1 DEN																												
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
0,041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
0,014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 DEN																												
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1,11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,37	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
0,014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3 DEN																												
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3,33	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1,11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
0,37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
0,041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
0,014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
4 DEN																												
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1,11	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
0,37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	
0,041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
0,014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
5 DEN																												
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1,11	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
0,37	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
0,041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
0,014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	

3.2.2. *Enterococcus faecalis*

Bakterie *Enterococcus faecalis* jsou bakterie, které způsobují závažná nozokomiální onemocnění, především infekční endokarditidu, infekce u novorozenců, infekce CNS a záněty kostí. Tyto bakterie jsou rovněž rezistentní vůči řadě používaných antimikrobiálních látek.

V následující Tabulce 5 jsou znázorněny výsledky po působení vzorku na bakterie 1 až 5 dní. Během prvního dne měly vzorky žádoucí opožděný nástup účinku antibakteriální aktivity.

Z výsledků lze vidět, že antibakteriální aktivitu u tohoto kmene bakterií vykazovaly pouze vzorky s obsahem oxidu měďnatého (15Cu/V/350, 45Cu/V/350, 60Cu/V/350, Cu28Zn/V/350, Cu45Zn/V/350, Cu60Zn/V/350). Tyto vzorky vykazovaly aktivitu při zředění 10 µg/ml. Při větším zředění 3,33 µg/ml vykazovaly aktivitu už pouze jen vzorky 15Cu/V/350, 45Cu/V/350 a 60Cu/V/350. Z těchto tří vzorků vykazoval vzorek 60Cu/V/350 aktivitu i při zředění 1,11 µg/ml. Z těchto výsledků lze vyvodit, že proti bakteriím *Enterococcus faecalis* působí antibakteriálně pouze vzorky s CuO a to v závislosti: čím větší koncentrace CuO ve vzorku, tím větší antibakteriální aktivita.

Proti bakteriím *Enterococcus faecalis* lze použít k dalšímu vývoji antibakteriálních látek vzorky s obsahem nanokompozitního materiálu na bázi CuO/vermikulit.

Enterococcus faecalis CMM 4224

[illegible]

3.2.3. *Escherichia coli*

Bakterie *Escherichia coli* způsobují zejména závažná průjemová onemocnění lidí i zvířat. Tyto bakterie mají schopnost proniknout do všech částí těla a způsobovat celou řadu onemocnění (infekce močových cest, průjemová a střevní onemocnění, a další). Tato bakterie také patří mezi nozokomiální kmen bakterií, časté nákazy jsou v nemocničním prostředí.

V následující Tabulce 6 jsou znázorněny výsledky po působení vzorku na bakterie 1 až 5 dní. Během prvního dne měly vzorky žádoucí opožděný nástup účinku antibakteriální aktivity.

Největší antibakteriální aktivitu vykazoval vzorek s největším hmotnostním zastoupením mědi – 60Cu/V/350. Po pátém dni byly neúčinnější vzorky 33Cu/V/350, 60Cu/V/350, Cu28Zn/V/350, Cu60Zn/V/350 a 60Zn/V/350. Při zředění 10 µg/ml vykazovaly antibakteriální aktivitu po pěti dnech všechny vzorky. Lze konstatovat, že proti bakteriím *Escherichia coli* jsou účinnější sloučeniny oxidu měďnatého.

I zde je z výsledků patrné, že připravené nanokompozitní materiály jsou antibakteriálně aktivní proti bakteriím *Escherichia coli* a lze je využít pro další výzkum a aplikace.

Tabulka 6: Antibakteriální aktivita testovaných vzorků na bakteriálním kmeni *Escherichia coli* CMM 3954

Escherichia coli CCM 3954																																			
ředění	15Cu/V/350	33Cu/V/350	45Cu/V/350	60Cu/V/350	Cu14Zn/V/350	Cu28Zn/V/350	Cu45Zn/V/350	Cu60Zn/V/350	15Zn/V/350	34Zn/V/350	45Zn/V/350	60Zn/V/350																							
1 DEN																																			
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
1,11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
0,37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 DEN																																			
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1,11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 DEN																																			
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1,11	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,37	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4 DEN																																			
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3,33	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1,11	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
0,37	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
0,041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 DEN																																			
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1,11	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
0,37	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
0,041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3.2.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* se běžně vyskytují v půdě, podzemních vodách, rostlinách, i v živých organismech jako jsou živočichové a člověk. Tyto bakterie jsou často zodpovědné za znehodnocení potravin včetně ovoce a zeleniny. Způsobují infekce při snížené odolnosti organismu, jako jsou např. infekce ran, močové a koroneální infekce, pneumonie a sepse.

V Tabulce 7 jsou znázorněny výsledky po působení vzorku na bakterie 1 až 5 dní. Během prvního dne měly vzorky žádoucí opožděný nástup účinku antibakteriální aktivity.

Vůči těmto bakteriím vykazovaly zkoumané vzorky nejmenší antibakteriální aktivitu. Vzorky pouze s oxidem zinečnatým – 15Zn/V/350, 34Zn/V/350, 45Zn/V/350 a 60Zn/V/350 nevykazovaly antibakteriální aktivitu ani při nejmenším zředění po pěti dnech testování. Nejúčinnějším vzorkem byl 60Cu/V/350, který po pěti dnech vykazoval antibakteriální aktivitu při zředěních 10, 3,33 a 1,11 µg/ml.

Z uvedených výsledků lze poukázat na to, že pro další aplikace antibakteriálních materiálů proti bakteriím *Pseudomonas aeruginosa* lze použít nanokompozitní materiály na bázi CuO/vermikulit.

Obecný závěr antibakteriálních testů:

Z provedených antibakteriálních testů lze konstatovat, že obecně všechny připravené experimentální vzorky projevují antibakteriální účinek, některé však ne proti všem zkoumaným bakteriím. Vzorky nanokompozitního materiálu na bázi oxidu zinečnatého na vermikulitové matici (15Zn/V/350, 34Zn/V/350, 45Zn/V/350 a 60Zn/V/350) nevykazují antibakteriální aktivitu vůči bakteriím *Enterococcus faecalis* a *Pseudomonas aeruginosa*.

Při nejvyšší koncentraci - 10 µg/ml byly antibakteriálně aktivní všechny vzorky s obsahem oxidu měďnatého, ať už samotného, nebo ve směsném nanokompozitním materiálu Zn-Cu-O.

Vzhledem k úspěšné antibakteriální aktivitě těchto vzorků mohou být použity k dalším výzkumům antibakteriálních vlastností.

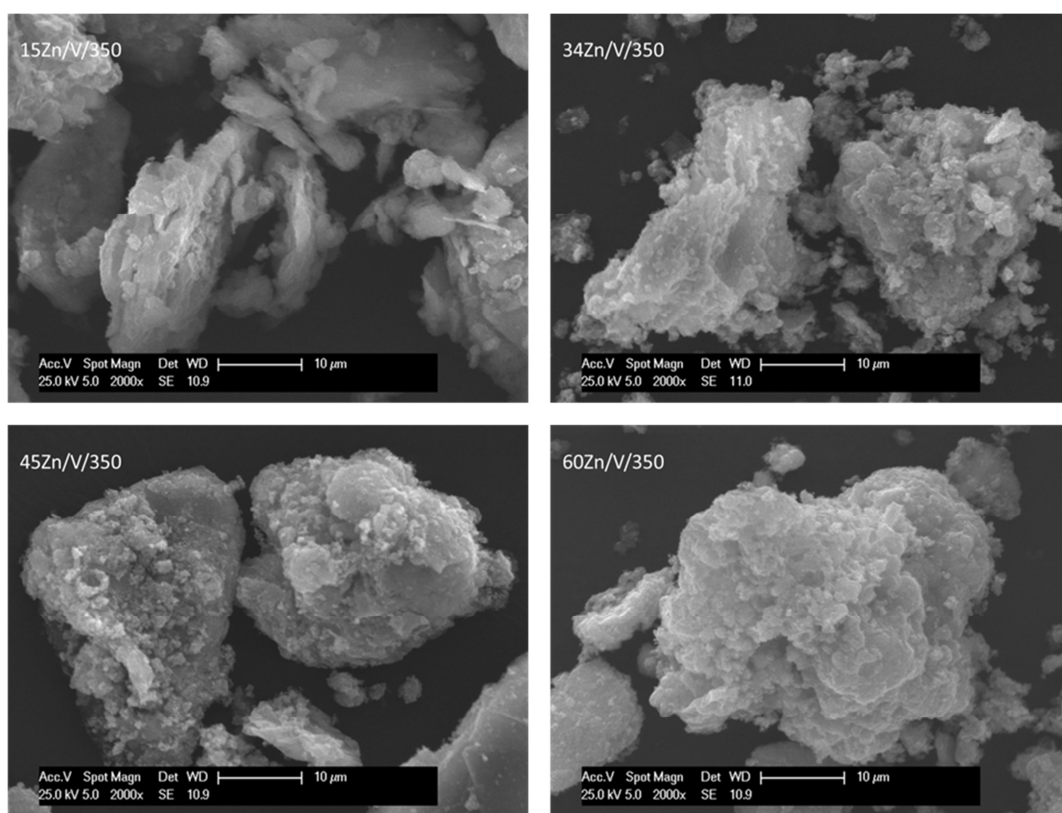
Tabulka 7: Antibakteriální aktivita testovaných vzorků na bakteriálním kmeni *Pseudomonas aeruginosa* CMM 1960

Pseudomonas aeruginosa CCM 1960																																																		
ředění	15Cu/V/350					45Cu/V/350					60Cu/V/350					Cu28Zn/V/350					Cu45Zn/V/350					Cu60Zn/V/350					15Zn/V/350					34Zn/V/350					45Zn/V/350					60Zn/V/350				
1 DEN																																																		
10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+																	
3,33	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
1,11	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
2 DEN																																																		
10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
3,33	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
1,11	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
3 DEN																																																		
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
3,33	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
1,11	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
4 DEN																																																		
10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
3,33	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
1,11	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
5 DEN																																																		
10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
3,33	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
1,11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	
0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	

3.3. Charakterizace nanokompozitů

3.3.1. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Vybrané vzorky, které byly podrobeny analýze antibakteriálních vlastností, byly charakterizovány detektorem sekundárních elektronů pomocí skenovacího elektronového mikroskopu PHILIPS XL-30 s rentgenovým spektrometrem EDAX. Vzorky byly nanесeny na terčíky pokryté oboustrannou uhlíkatou páskou a dvakrát naprášeny v zařízení pro naprašování povrchu vzorků POLARON SC 7640 směsí zlato-paladium. Vzorky byly vloženy do komory elektronového mikroskopu, která byla následně odvákuována. Každý ze vzorků byl charakterizován při zvětšeníh 500x, 2000x a 3500x.

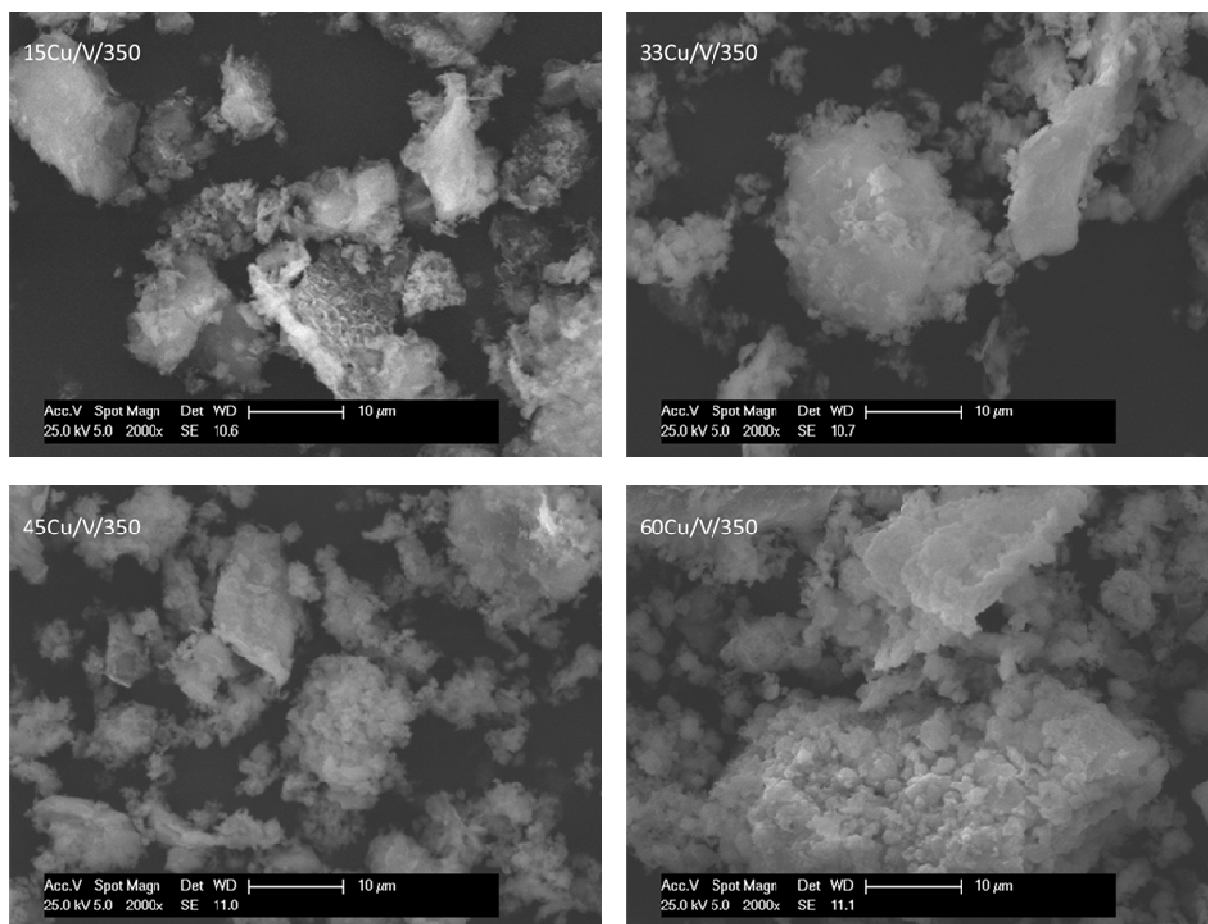


Obr. 4: SEM snímky nanokompozitů na bázi Zn/V/350 o různých koncentračních zastoupeních.

Na Obr. 4 jsou snímky nanokompozitů na bázi ZnO/vermikulit. Jsou zde zobrazeny snímky vzorků různých koncentrací – 15, 34, 45 a 60 hm. % oxidu zinečnatého na vermikulitové matrici, kalcinované při teplotě 350°C. Ze snímků je patrný nárůst množství

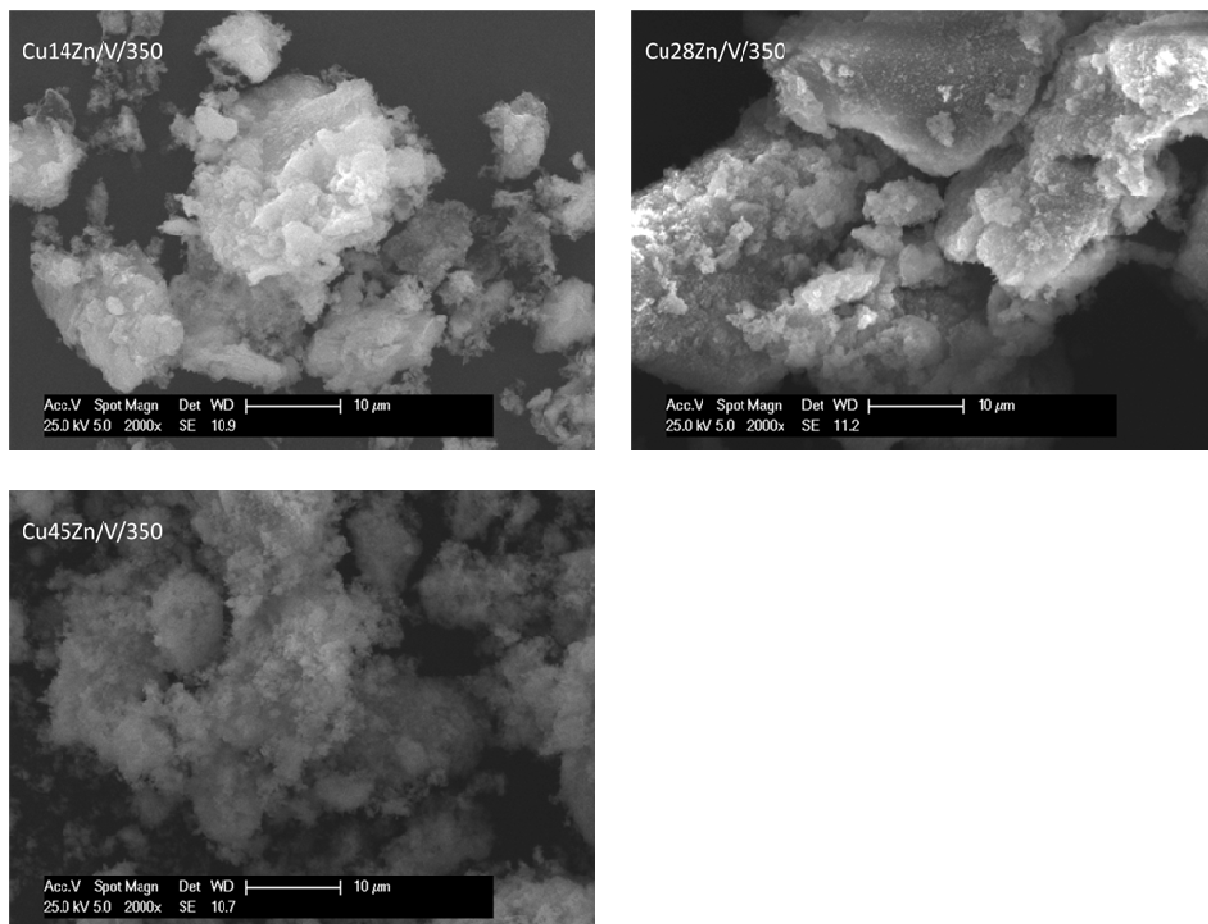
částic oxidu zinečnatého, které se velikostně pohybují v řádech mikrometrů a přispívají k agregaci částic. Ze snímku lze vidět, že částice ZnO přednostně krystalizují na plochách vermikulitové matrice.

Na Obr. 5 jsou snímky nanokompozitů na bázi CuO/vermikulit. Jsou zde zobrazeny snímky vzorků různých koncentrací – 15, 33, 45 a 60 hm. % oxidu měďnatého na vermikulitové matrici, kalcinované při teplotě 350°C. Částice oxidu měďnatého tvoří nehomogenně rozptýlené shluky různých velikostí, které krystalizují na povrchu vermikulitových desek.



Obr. 5: SEM snímky nanokompozitů na bázi Cu/V/350 o různých koncentračních zastoupeních.

Na Obr. 6 jsou snímky nanokompozitů na bázi Zn-Cu-O/vermikulit. Jsou zde zobrazeny snímky vzorků různých koncentračních zastoupení. Opět lze vidět, že zde dochází ke shlukování připravených oxidů a jejich růst na plochách a hranách částic vermikulitu.



Obr. 6: SEM snímky nanokompozitů na bázi CuZn/V/350 o různých koncentračních zastoupeních.

U charakterizovaných experimentálních vzorků byly provedeny kvantitativní charakterizace pomocí elektronového mikroanalyzátoru EDAX (Energy-Dispersed Analysis of X-rays). Byla provedena prvková bodová analýza zkoumaných částic, její výsledky jsou shrnuty v Tabulce 8. Vzhledem k tomu, že se jedná o bodovou analýzu vybraných částic, jde o orientační přehled prvků náhodně vybraných částic vzorků, které ne vždy musí přesně odpovídat celkovému složení. I přesto bylo zjištěno, že elementární složení příslušných

nanokompozitních materiálů odpovídá připravovaným koncentračním poměrům oxidů kovů, které byly potvrzeny rtg. fluorescenční spektroskopií.

Tabulka 8: Prvková analýza vzorků.

(hm. %)	O	Mg	Al	Si	Cl	K	Fe	Cu	Zn
15Zn/V/350	34,73	12,92	8,69	20,65		1,38	5,15		16,48
34Zn/V/350	31,78	7,03	5,57	14,54		1,41	3,54		36,14
45Zn/V/350	31,94	10,71	6,32	16,25		1,84	3,78		29,16
60Zn/V/350	16,92	3,16	2,12	4,84					72,95
15Cu/V/350	33,3	12,98	8,59	22,95	2,12	2,83	6,13	11,1	
33Cu/V/350	34,04	11,06	6,33	15,12	5,63	1,1	3,03	23,69	
45Cu/V/350	25,43	4,57	3,05	6,69	11,9	0,78	1,87	46,22	
60Cu/V/350	20,73	5,69	2,93	6,74	9,58	0,99	1,66	51,68	
Cu14Zn/V/350	32,95	6,97	5,68	14,49	3,09	1,36	2,75	23,72	8,98
Cu28Zn/V/350	21,81	3,77	2,75	7,94	1,82	1,48	2,38	18,66	39,39
Cu45Zn/V/350	18,87	3,71	2,37	4,97	2,08	0,87	1,57	17,57	48,01

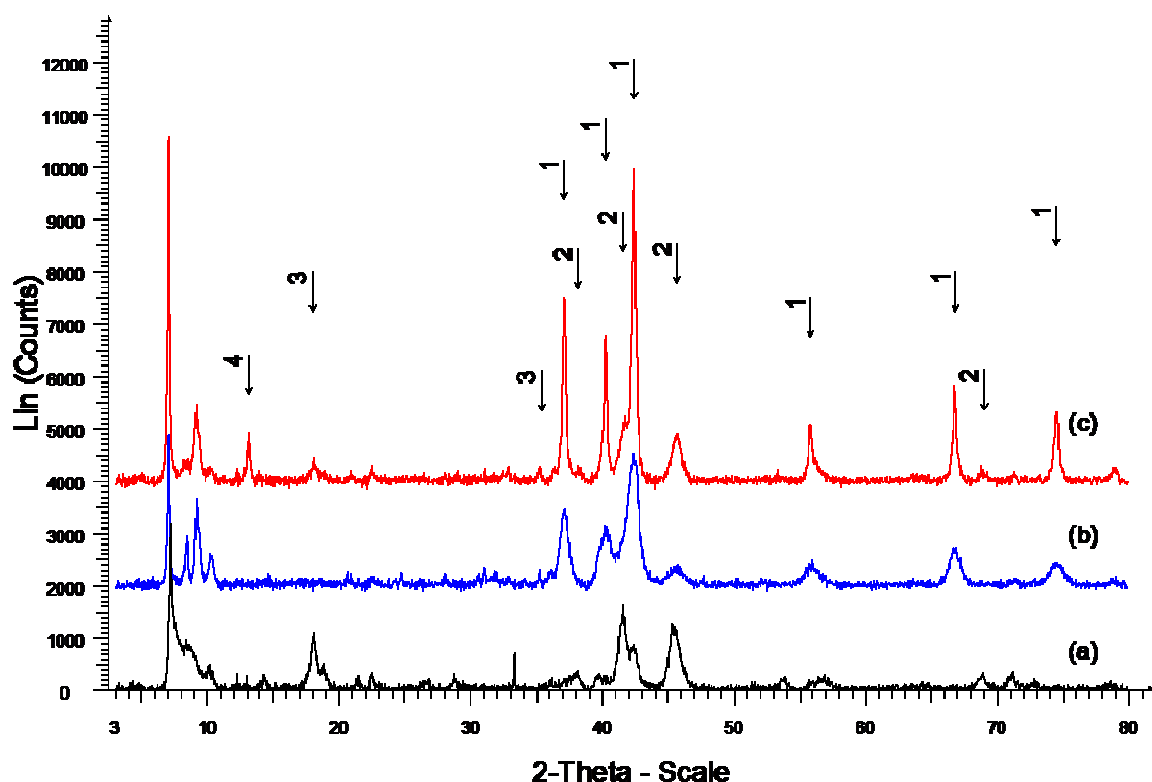
3.3.2. Rentgenová difrakční analýza (RTG)

Vzorky Cu14Zn/V/350, Cu28Zn/V/350, Cu28Zn/V/650 a Cu45Zn/V/350 byly měřeny na rentgenovém práškovém difraktometru BRUKER D8 ADVANCE s CoK(α) lampou. Pro identifikaci přítomných fází byla použita databáze PDF-2 Release 2004. Byly vybrány tyto vzorky z důvodu potvrzení jejich identického fázového složení.

Na Obr. 6 je difrakční záznam vzorků (a) Cu14Zn/V/350, (b) Cu28Zn/V/350 a (c) Cu45Zn/V/350. Z difrakčního záznamu je patrné, že vzorky obsahují jako majoritní fázi ZnO (píky 1). Jedná se o hexagonální typ krystalografické mřížky. Zároveň byl také u vzorků potvrzen obsah CuO (píky 2), typ mřížky monoklinická bazálně centrovaná. U měřených vzorků byl také detekován obsah CuCl₂, které bylo již dříve stanoveno ve vzorcích s obsahem CuO, ze kterých při mechanochemické syntéze lze tento chlorid špatně odstranit pouhým

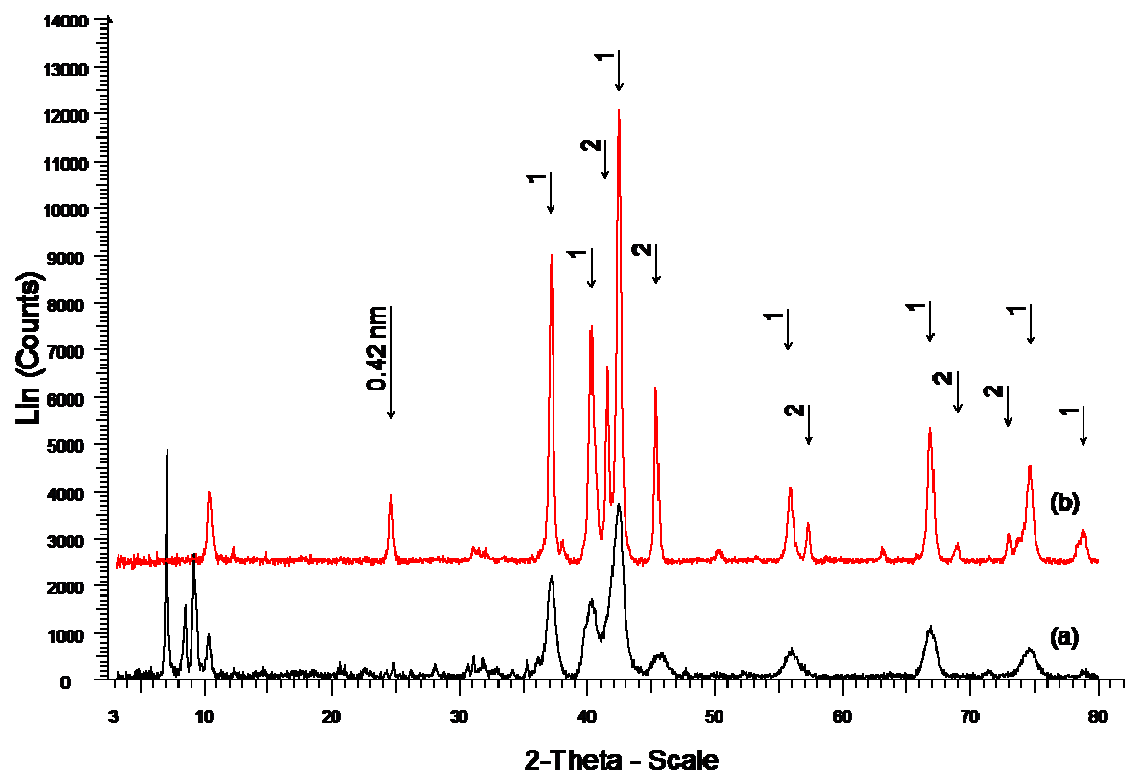
promýváním vzorku v destilované vodě. Píky na levé straně odpovídají difrakčnímu záznamu vermikulitu [59].

Porovnáním těchto tří vzorků bylo zjištěno, že jsou srovnatelného složení, s rostoucí koncentrací ZnO ve vzorcích (14 hm.%, 28 hm.% a 45 hm.%) roste také intenzita píků ZnO v difrakčním záznamu. U vzorku Cu45Zn/V/350 došlo také ke vzniku sloučeniny $\text{Zn}_5(\text{OH})_8\text{Cl}_2\text{H}_2\text{O}$ (hydrát chloridu hydroxidu zinečnatého, s romboedrickou krystalografickou mřížkou).



Obr. 6: Difrakční záznam vzorků: (a) Cu14Zn/V/350, (b) Cu28Zn/V/350, (c) Cu45Zn/V/350.

Na Obr. 7 je difrakční záznam vzorků (a) Cu28Zn/V/350 a (b) Cu28Zn/V/650. U těchto vzorků byl opět stanoven obsah ZnO (píky 1) a CuO (píky 2). Při zvyšování teploty kalcinace dochází k zaostření a zvýšení intenzity píků ZnO a CuO. Zároveň lze konstatovat, že při kalcinaci na 650°C dochází k vymizení píku vermikulitu v důsledku fázové přeměny na metavermikulit (aluminium silikát).



Obr. 7: Difrakční záznam vzorků: (a) Cu₂₈Zn/V/350, (c) Cu₂₈Zn/V/650.

4. ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byla provedena rešerše na téma využití nanočástic a nanokompozitních materiálů v medicínských a biomedicínských aplikacích. Všechny cesty podání nanočástic do těla (ústa, plíce, pokožka a žilní podání) mají své klady a zápory. U některých nanočástic je již popsána jejich implementace do těla a potenciální rizika, která hrozí z jejich hromadění v orgánech a tkáních. Bylo zjištěno, že u mnohých definovaných nanočástic toto chování ještě není zcela popsáno. Byly také shrnuty bakteriální kmeny, které jsou problematické na poli traumatologie a stomatologie, které způsobují závažné choroby, z nichž jsou některé rezistentní vůči antibiotikům.

V rámci diplomové práce byly připraveny experimentální vzorky nanokompozitů na bázi ZnO/vermikulit, CuO/vermikulit a Zn-Cu-O/vermikulit pomocí mechanochemické syntézy. Připravené vzorky byly charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie a rentgenové difrakce. Pořízené snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu ukazují, že ZnO a CuO tvoří shluky částic, které se vážou přednostně na plochách vermikulitových částic. Pomocí EDAX detektoru byla také provedena prvková analýza vzorků, která potvrdila předpokládané složení vzorků.

Rentgenovou difrakční analýzou byla zkoumána fázová složení připravených vzorků nanokompozitů Zn-Cu-O/vermikulit o různých koncentracích a dvou vzorků o stejné koncentraci vykalcinovaných na dvě různé teploty. Z uvedených difrakčních záznamů je zřejmé, že s rostoucím obsahem oxidu zinečnatého a oxidu měďnatého v kompozitním materiálu a jeho kalcinací dochází k zaostření a zvýšení intenzity píku oxidu zinečnatého, což je dáno rekrystalizací a růstem krystalových zrn ZnO a CuO. Při kalcinaci kompozitního materiálu na teplotu 650 °C došlo současně k vymizení píku vermikulitu v důsledku fázové přeměny přírodního vermikulitu na metavermikulit.

Dále byla zkoumána antibakteriální aktivita experimentálních vzorků na bakteriálních kmenech *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960. Nejlepší antibakteriální aktivitu vykazoval vzorek nanokompozitního materiálu CuO na vermikulitové matici (60Cu/V/350). Vůči všem čtyřem druhům bakterií jsou účinné při koncentraci 10 µg/ml všechny vzorky

s obsahem CuO a nanokompozitu Zn-Cu-O. Všechny zkoumané experimentální vzorky mají žádoucí opožděný nástup účinku, ke kterému dochází vždy po 1 dni působení vzorků na bakterie.

V rámci diplomové práce byl sledován vliv vzorků nanokompozitů o různých složeních na jejich antibakteriální vlastnosti. Ze získaných výsledků lze vyvodit, že všechny připravené nanokompozity vykazují antibakteriální aktivitu, některé jsou aktivní pouze pro vybrané bakteriální kmeny. Bylo zjištěno, že přítomnost vermikulitové matrice navyšuje antibakteriální účinek, který je navíc umocněn vyšším koncentračním zastoupením oxidů na jejich povrchu.

Deklarované cíle diplomové práce byly splněny.

Tato diplomová práce vznikla v rámci řešení projektu SP 2014/39 „Funkční nanostrukturované materiály“ a projektu CZ.1.05/1.1.00/02.0070 „IT4 Innovations Centre of Excellence project“.

Literatura

- [1] Medical. *Dictionary.com*. <http://dictionary.reference.com/browse/medical?s=t> (ze dne 3.4.2014).
- [2] Yildirim, L.; Thanh, N. T. K.; Loizidou, M.; Seifalian, A. M. Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. *Nano Today* **2011**, 6, 585–607
- [3] Cheng, R.; Feng F.; Meng F.; Deng Ch.; Feijen J.; Zhong Z. Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery, *J. Controlled Release* **2011**, 152, 2–12.
- [4] Pan, J.; Wan, D.; Gong, J. PEGylated liposome coating QDs/mesoporous silica core-shell nanoparticles for molecular imaging, *Supplementary Material for Chemical Communications* **2011**.
- [5] Liu, Z.; Tabakman S.; Welsher, K.; Dai, H.: Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: In vitro and in vivo Detection, Imaging and Drug Delivery, *Nano Res.* **2009**, 2 (2), 85-120.
- [6] Yang, W.; Peters, J. I.; Williams III, R. O.: Inhaled nanoparticles – A current review, *International Journal of Pharmaceutics*. **2008**, 356, 239-247.
- [7] Patton, J. S.; Byron, P. R. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs, *Nature Reviews, Drug Discovery*. **2007**, 6.
- [8] Oberdorster, G.; Elder, A.; Rinderknecht A. Nanoparticles and the Brain: Cause for Concern?, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, 9(8), 4996-5007.
- [9] Vokurka, M.; Hugo, J.: Praktický slovník medicíny, 8. rozšířené vydání, MAXDORF s. r. o., **2007**, 520 s.
- [10] Sonavane, G.; Tomoda, K.; Sano, A.; Ohshima, H.; Terada, H.; Makino, K. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2008**, 65, 1-10.

- [11] Wang, H.; Huff, T. B.; Zweifel, D. A.; He, W.; Low, P. S.; Wei, A.; Cheng, J. In vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single gold nanorods; *PNAS*, **2005**, 102 (44), 127522-15756.
- [12] *Nanosilver*. <http://www.nanosilver.cz/> (ze dne 24.3.2014).
- [13] Fung, M. C.; Bowen, D. L. Silver Products for Medical Indications: Risk-Benefit Assessment; *Clinical Toxicology*, **1996**, 34(1), 119-126.
- [14] Hussain, S. M.; Hess, K. L.; Gearhart, J. M.; Geiss, K. T.; Schlager, J. J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells, *Toxicology in Vitro*, **2005**, 19, 975-983.
- [15] Arora, S.; Jain, J.; Rajwade, J. M.; Paknikar, K. M. Cellular responses induced by silver nanoparticles. *Toxicology Letters*; **2008**, 179, 93-100.
- [16] Zhang, X.; Wu, H.; Wu, D.; Wang, Y.; Chang, J.; Zhai, Z.; Meng, A.; Liu, P.; Zhang, L.; Fan, F. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes, *International Journal of Nanomedicine*. **2010**, 5, 771-781.
- [17] Lankveld, D. P. K.; Oomen, A. G.; Krystek, P.; Neigh, A.; Troost-de Jong, A.; Noorlander, C. W.; Van Eijkeren, J. C. H.; Geertsma, R. E.; De Jong, W. H. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials*, **2010**, 31, 8350-8361.
- [18] Lin, W.; Huang, Y.; Zhou, X.; Ma, Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2006**, 217, 252-259.
- [19] Akhtar, M. J.; Ahamed, M.; Kumar, S.; Siddiqui, H.; Patil, G.; Ashquin, M.; Ahmad, I. Nanotoxicity of pure silica mediated through oxidant generation rather than glutathione depletion in human lung epithelial cells. *Toxicology*, **2010**, 276, 95-102.
- [20] Kim, J. S.; Yoon, T.; Yu, K. N.; Kim, B. G.; Park, H. W.; Lee, K. H.; Park, S. B.; Lee, J.; Cho, M. H. Toxicity and Tissue Distribution of Magnetic Nanoparticles in Mice. *Toxicological Sciences*, **2006**, 89(1), 338-347.

- [21] Kumar, R.; Roy, I.; Ohulchanskyy, T. Y.; Vathy, L. A.; Bergey, E. J.; Sajjad, M.; Prasad, P. N. In vivo Biodistribution and Clearance Studies using Multimodal ORMOSIL Nanoparticles. *ACS Nano*. **2010**, 4(2), 699-708.
- [22] Nishimori, H.; Kondoh, M.; Isoda, K.; Tsunoda, S. Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *European Journal of Pharmaceutics*, **2009**, 72, 496-501.
- [23] Bennat, C.; Muller-Goymann, C. C. Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter.. *Int J Cosmet Sci*. **2000**, 22 (4), 271–283.
- [24] Warheit, D. B.; Laurence, B. R.; Reed, K. L.; Roach, D. H.; Reynolds, G. A. M.; Webb, T. R. Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. *Toxicological Science*, **2004**, 77, 117-125.
- [25] Muller, J.; Huaux, F.; Moreau, N.; Misson, P.; Heilier, J.; Delos, M.; Arras, M.; Fonseca, A.; Nagy, J. B.; Lison, D. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2005**, 207, 221-231.
- [26] Takagi, A.; Hirose, A.; Nishimura, T.; Fukumori, N.; Ogata, A.; Ohasho, N.; Kitajima, S.; Kanno, J. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J.Toxicol. Sci.*, **2008**, 33(1), 105-116.
- [27] Yang, H. Nanoparticle-mediated Brain-Specific Drug Delivery, Imaging, and Diagnosis, *Pharm. Res.*, **2010**, 29(9), 1795-1771.
- [28] Lee, J.; Smith, M. A.; Liu, W.; Gold, E. M.; Lewis, B.; Song, H.; Frank, J. A. Enhances stem cell tracking via electrostatically assembled fluorescent SPION-peptide complexes, *Nanotechnology*, **2009**, 20(35).
- [29] Ito, A.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T. Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles, *J. of Bioscience and Bioengineering*, **2005**, 100(1), 1-11.
- [30] Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, **2005**, 26, 3995-4021.

- [31] Hajipour, M. J.; Fromm, K. M.; Ashkarran, A. A.; Aberasturi, D. J.; Larramendi, I. R.; Rojo, T.; Serpooshan, V.; Parak, W. J.; Mahmoudi, M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* **2012**, 30 (10), 499–511.
- [32] Hamouda, I. M. Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *J. of Biomedical Research* **2012**, 26 (3), 143–151.
- [33] Zhang, L.; Ding, Y.; Povey, M.; York, D. ZnO nanofluids – A potential antibacterial agent. *Progress in Natural Science* **2008**, 18 (8), 939–944.
- [34] Zhang, L.; Jiang, Y.; Ding, Y.; Povey, M.; York, D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *J. of Nanoparticle Research* **2007**, 9, 479–489.
- [35] Ren, G.; Hu, D.; Cheng, E. W. C.; Vargas-Reus, M. A.; Reip, P.; Allaker, R. P. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int. J. of Antibacterial Agents* **2009**, 33, 587–590.
- [36] Sohrabnezhad, S.; Mehdipour Moghaddam, M. J.; Salavatiyan, T. Synthesis and characterization of CuO–montmorillonite nanocomposite by thermal decomposition method and antibacterial activity of nanocomposite. *Spectrochim. Acta, Part A.* **2014**, 125, 73–78.
- [37] Palcheva, R.; Dimitrov, L.; Tyuliev, G.; Spojakina, A.; Jiratova, K. TiO₂ nanotubes supported NiW hydrodesulphurization catalysts: Characterization and activity. *Applied Surface Science* **2013**, 265, 309–316.
- [38] Minetto, D.; Libralato, G.; Ghirardini, A. V. Ecotoxicity of engineered TiO₂ nanoparticles to saltwater organisms: An overview. *Environ. Int.* **2014**, 66, 18–27.
- [39] Enayati-Jazi, M.; Solati-Hashjin M.; Nemat A.; Bakhshi F.; Synthesis and characterization of hydroxyapatite/titania nanocomposites using in situ precipitation technique. *Supelattices and Microstrictures* **2012**, 51, 877–885.

- [40] Kanmani, P.; Rhim, J. W. Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. *Food Hydrocolloids* **2014**, 35, 644–652.
- [41] Taju, G.; Majeed, S. A.; Nambi, K. S. N.; Hameed, A. S. S. In vitro assay for the toxicity of silver nanoparticles using heart and gill cell lines of Catla catla and gill cell line of Labeo rohita. *Comp. Biochem. Physiol., C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.* **2014**, 161, 41–52.
- [42] Hule, R. A.; Pochan, D. J. Polymer Nanocomposites for Biomedical Applications. *MRS BULLETIN* **2007**, 32.
- [43] Mirsasaani, S. S.; Manjili, M. H.; Baheiraei, N.; ; *Dental Nanomaterials*. Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites, 1. vydání.; In Tech, **2001**; kapitola 20, str. 441–474.
- [44] Kanaparthi, R.; Kanaparthi, A. The changing face of dentistry: nanotechnology. *Int. J. of Nanomedicine* [Online] **2011**, 6, 2799-2804.
- [45] Hamouda, I. M. Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* **2012**, 26 (3), 143–151.
- [46] Fabbro, A.; Prato, M.; Ballerini, L. Carbon nanotubes in neuroregeneration and repair. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, 65, 2034–2044.
- [47] Engel, E.; Michiardi, A.; Navarro, M.; Lacroix, D.; Planell, J. A. Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. *Trends Biotechnol.* **2008**, 26 (1), 39–47.
- [48] Breathnach, A. S. Nosocomial infections. *Medicine* **2009**, 37 (10), 557–561.
- [49] Wang, W.; Tao, R.; Tong, Z.; Ding, Y.; Kuang, R.; Zhai, S.; Liu, J.; Ni, L. Effect of a novel antimicrobial peptide chrysopsin-1 on oral pathogens and Streptococcus mutans biofilms. *Peptides* **2012**, 33 (2), 212–219.

- [50] Ding, Y.; Wang, W.; Fan, M.; Tong, Z.; Kuang, R.; Jiang, W.; Ni, L. Antimicrobial and anti-biofilm effect of Bac8c on major bacteria associated with dental caries and *Streptococcus mutans* biofilms. *Peptides* **2014**, 52, 61–67.
- [51] Kayser, F. H.; Bienz, K. A.; Eckert, J.; Zinkernagel, R. M. Color atlas of medical microbiology [online]; Thieme, **2005**, 724 str. Dostupné z: http://www.ebook3000.com/Medical-Microbiology_93593.html (ze dne 13.3.2014).
- [52] Wardell, P. Gram-positive *Enterococcus faecalis* sp. bacteria, **2011**. *Microbe World*. Dostupné z: <http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=7018> (ze dne 13.2.2014).
- [53] Carr, J. H. Encyklopedia Britannica. Dostupné z: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/147082/Colorized-scanning-electron-micrograph-depicting-a-number-of-Gram-negative> (ze dne 13.2. 2014).
- [54] *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infectionl, **2013**. *Klebsiella pneumoniae*. Dostupné z: http://klebsiella-pneumoniae.org/klebsiella_pneumoniae_urinary_tract_infection.html (ze dne 13.2.2014).
- [55] *Proteus Mirabilis* Gram Stain Picture. Dostupné z: http://www.picstopin.com/1616/proteus-mirabilis-gram-stainjpg/http:%7C%7Cwww*napavalley*edu%7Cpeople%7Csrose%7CPublishingImages%7CProteus%20mirabilis%20-%20Gram%20Stain*jpg/ (ze dne 13.2.2014).
- [56] Motarjemi, Y., Moy, G., Todd, E., Ed. Encyclopedia of Food Safety, Svazek 1, 1. vydání; *Academis Press*, **2014**, 2356 str. ISBN: 978-0-12-378612-8.
- [57] Murray, B. E. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis.* **1998**, 4 (1), 37–47.
- [58] *Klebsiella species*, **2009**. Charles River Laboratoires International. Dostupné z: http://www.criver.com/files/pdfs/infectious-agents/rm_ld_r_klebsiella_spp.aspx (ze dne 13.2.2014).

- [59] Bukáčková, M.; Čech Barabaszová, K. Nanokompozity na bázi oxidů kovů a jejich antibakteriální stabilita. *Bakalářská práce*, Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, **2012**. 38 s.
- [60] Schindler, J. Ze života bakterií, 1. vydání.; *Academia*: Praha, **2008**, 144 str. ISBN 978-80-200-1666-9.